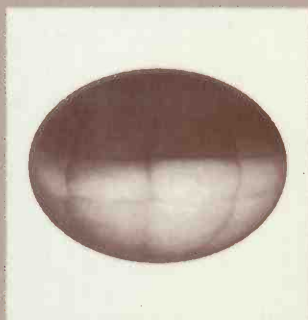


OTILIA ZĂRNESCU



EMBRIOLOGIE

EXPERIMENTALĂ

III 277.983

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU” IAȘI
III 277.983

OTILIA ZĂRNEȘCU

OTILIA ZĂRNEȘCU

EMBRIOLOGIE EXPERIMENTALĂ

Ediția Universității din București

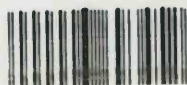
- 1993 -

OTILIA ZĂRNESCU

370 402

PREFATA

EMBRIOLOGIE EXPERIMENTALĂ



369345

B.C.U. IAB



Editura Universității din București

— 2003 —

© Editura Universității din București
Șos. Panduri, 90-92, București - 050663; Telefon/Fax: 410.23.84
E-mail: editura@unibuc.ro
Internet: www.editura.unibuc.ro

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
ZĂRNESCU, OTILIA

Embriologie experimentală / Otilia Zărnescu - București:
Editura Universității din București, 2003
Bibliogr.
ISBN 973-575-810-5

611.013

31 AUG. 2004

"Dacă nu vom găsi nimic plăcut, cel puțin aflăm ceva nou"
(Voltaire, Candid)

PREFAȚĂ

Progresele remarcabile realizate în ultimii ani în Biologia dezvoltării decurg dintr-un număr enorm de abordări experimentale, unele reconsiderând experimentele clasice dintr-o perspectivă moleculară. Cu toate acestea, nu s-a urmărit o prezentare exhaustivă a embriologiei experimentale, manualul dorindu-se mai degrabă o sursă de informații complementare și obligatorii pentru înțelegerea cursurilor predate studenților biologi și biochimisti și un ghid pentru cei care doresc să aprofundeze un aspect al acestui domeniu fascinant. Lucrarea reprezintă prima sinteză de embriologie experimentală apărută în România, cu o colecție de tehnici, dintre care multe sunt abordate prin prisma experienței profesionale a autoarei.

Manualul de tehnici a fost scris și din dorința de a prezenta dimensiunile și complexitatea cercetărilor în domeniul embriologiei actuale care trebuie să îmbine abilitățile metodelor clasice cu performanțele celor moleculare.

Biologia dezvoltării studiază embriogeneza tuturor speciilor animale, însă majoritatea experimentelor sunt realizate pe șase specii, denumite organisme model: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus domestica* și *Mus musculus*. Din acest motiv, primul capitol prezintă pe larg cele șase specii, sub aspectul avantajelor și dezavantajelor experimentale, precum și al modului de obținere, observare și identificare a diferitelor stadii embrionare. Metodele prezentate în celelalte cinci capitole sunt exemplificate pe aceste specii, însă ele se pot realiza pe orice tip embrionar.

Nu toate metodele menționate în manual se pot realiza efectiv în cadrul laboratoarelor cu studenții (în general cele care fac obiectul capitolului 2) datorită aparaturii sofisticate, reactivilor costisitori sau a duratei experimentului. Cu toate acestea, pornind de la convingerea că informațiile teoretice prezentate la curs nu pot fi înțelese decât prin descifrarea logicii experimentale, aceste tehnici fac obiectul seminariilor.

Forma definitivă a manualului a ținut cont de sugestiile și observațiile referenților, Prof. Dr. Dana Iordăchescu și Prof. Dr. Viorica Manolache, cărora le mulțumesc pentru amabilitatea și timpul acordat lecturării manuscrisului.

Rămân recunoscătoare doamnei cercetător gr.II, Lucia Moldovan pentru ajutorul acordat în finalizarea manualului.

Mulțumesc doamnei cercetător Marinela Flămânzeanu pentru ajutorul acordat în scanarea imaginilor prezentate.

CUPRINS

Capitolul 1

Obținerea și manipularea embrionilor.....	11
<i>Caenorhabditis elegans</i>	14
I. Izolarea embrionilor.....	16
A. Obținerea embrionilor dintr-o populație de hermafrodiți.....	16
<i>Protocol experimental</i>	16
B. Obținerea embrionilor timpurii prin disecție.....	17
<i>Protocol experimental</i>	17
II. Permeabilizarea embrionilor.....	18
A. Permeabilizarea embrionilor cu hipoclorit de sodiu	18
<i>Protocol experimental</i>	18
B. Permeabilizarea embrionilor cu o soluție de chitinază.....	18
<i>Protocol experimental</i>	18
C. Îndepărtarea anvelopei viteline.....	19
III. Identificarea și observarea stadiilor embrionare.....	19
IV. Medii și soluții.....	21
<i>Drosophila melanogaster</i>	22
I. Recoltarea embrionilor.....	23
II. Observarea stadiilor embrionare.....	24
<i>Protocol experimental</i>	25
III. Medii și soluții.....	32
<i>Danio rerio</i>	32
I. Recoltarea și cultivarea embrionilor.....	33
<i>Protocol experimental</i>	33
II. Permeabilizarea și observarea embrionilor.....	33
A. Îndepărtarea corionului și manipularea embrionilor timpurii.....	33
<i>Protocol experimental</i>	34
B. Manipularea embrionilor avansați.....	34
<i>Protocol experimental</i>	34
III. Observarea stadiilor embrionare.....	35
IV. Medii și soluții.....	39
<i>Xenopus laevis</i>	40
I. Izolarea și cultivarea ovocitelor.....	41
A. Obținerea unui număr mic de ovocite (defoliculare manuală).....	41
<i>Protocol experimental</i>	41
B. Obținerea unui număr mare de ovocite.....	43
<i>Protocol experimental</i>	43
C. Cultivarea ovocitelor.....	43
<i>Protocol experimental</i>	43
II. Euclearea ovocitelor.....	44
<i>Protocol experimental</i>	44
III. Obținerea gameților pentru fecundarea <i>in vitro</i>	44
<i>Protocol experimental</i>	44
IV. Manipularea și observarea embrionilor.....	45
V. Medii și soluții.....	48
<i>Gallus domestica</i>	49

I. Obținerea stadiilor embrionare.....	50
II. Cultivarea embrionilor.....	51
A. Cultura <i>in ovo</i>	51
<i>Protocol experimental 1</i>	51
<i>Protocol experimental 2</i>	53
B. Cultura fără coajă.....	55
C. Cultura pe suport de plasmă sau agar.....	55
<i>Protocol experimental</i>	56
D. Cultura pe membrana vitelină.....	56
<i>Protocol experimental 1</i>	57
<i>Protocol experimental 2</i>	58
III. Observarea stadiilor embrionare.....	59
IV. Medii și soluții.....	68
<i>Mus musculus</i>	69
I. Izolarea ovocitelor imature și pre-ovulatorii.....	69
<i>Protocol experimental</i>	70
II. Izolarea zigoților.....	73
A. Împerecherea naturală.....	73
B. Fecundarea <i>in vitro</i>	73
<i>Protocol experimental</i>	74
III. Izolarea embrionilor pre-implanționali.....	75
<i>Protocol experimental</i>	76
IV. Izolarea embrionilor post-implanționali.....	77
A. Stadiul de neurulă timpurie.....	78
<i>Protocol experimental</i>	79
B. Stadiul somitic timpuriu (8 zile jumătate post-inseminare).....	79
<i>Protocol experimental</i>	79
C. Izolarea anexelor extraembrionare.....	79
<i>Protocol experimental</i>	79
D. Sexarea embrionilor prin colorarea nucleilor celulelor amniotice..	82
<i>Protocol experimental</i>	82
V. Cultivarea embrionilor.....	83
<i>Protocol experimental</i>	85
VI. Vasectomizarea masculilor și pregătirea femelelor pseudogestante..	86
<i>Protocol experimental</i>	86
VII. Transferul zigoților și embrionilor.....	87
<i>Protocol experimental</i>	87
VIII. Colorarea <i>in toto</i> a osului și cartilajului.....	89
<i>Protocol experimental</i>	90
IX. Stadii embrionare.....	91
X. Medii și soluții.....	96

Capitolul 2

Metode de transgeneză și mutagenезă direcționată.....	99
I. Elemente transpozabile.....	100
<i>Protocol experimental</i>	103
II. Infectarea embrionilor cu vectori retrovirali.....	105
<i>Protocol experimental</i>	106
III. Microinjectarea transgenei în nucleii spermatozoizilor de amfibieni...	107
<i>Protocol experimental</i>	109
IV. Microinjectarea ADN în pronucleii ovulelor fecundate de șoarece.....	113

<i>Protocol experimental</i>	119
V. Metode de transfer genic în celulele stem embrionare.....	122
A. Tipuri de celule stem cu origine embrionară.....	122
B. Introducerea genelor în celulele stem embrionare.....	129
C. Organisme knock-out.....	132
D. Knock-out condițional.....	136
VI. Izolarea, cultivarea și manipularea celulelor stem embrionare.....	140
A. Pregătirea stratului hrănitor de fibroblaste.....	140
<i>Protocol experimental</i>	140
B. Inactivarea mitotică a fibroblastelor.....	141
<i>Protocol experimental</i>	141
C. Izolarea celulelor stem embrionare.....	141
<i>Protocol experimental</i>	142
D. Electroporarea celulelor stem embrionare.....	143
<i>Protocol experimental</i>	143
E. Identificarea embrionilor sau șoarecilor transgenici homozigoți....	144
VII. Knock-out post-transcripțional.....	145
A. Interferența ARN.....	145
B. Oligonucleotide antisens - tehnica morpholino.....	147
VIII. Medii și soluții.....	151
Capitolul 3	
Metode de analiză a descendențelor celulelor embrionare.....	155
I. Marcarea cu trasori.....	157
A. Trasori intracelulari.....	158
<i>Protocol experimental de injectare a trasorilor intracelulari la amfibieni</i>	163
B. Trasori membranari lipofilici fluorescenți.....	164
<i>Protocol experimental de marcarea epiblastului la șoarece cu trasori lipofilici</i>	166
C. Trasori fluorescenți fotoactivabili.....	168
II. Transplantarea celulelor embrionare.....	169
A. Transplantarea unei blastomere marcate la <i>Xenopus laevis</i>	169
<i>Protocol experimental</i>	169
B. Transplantarea blastomerelor de amfibian la situsuri ectopice în embrioni gazdă.....	171
<i>Protocol experimental</i>	171
C. Cultivarea blastomerelor de <i>Xenopus laevis</i>	172
III. Realizarea de himere.....	172
A. Himere interspecifice găină-prepeliță.....	172
<i>Protocol experimental</i>	174
B. Himere intraspecifice de șoarece.....	176
<i>Protocol experimental</i>	176
IV. Metode genetice de urmărire a descendențelor celulare.....	178
A. Clone mitotice.....	178
B. Infectarea cu vectori retrovirali.....	182
<i>Protocol experimental de injectare a vectorilor retrovirali în embrionii de șobolan</i>	184
C. Recombinare <i>lacZ</i>	185
D. Recombinare Cre- <i>loxP</i>	188
V. Medii și soluții.....	190

Capitolul 4

Metode de caracterizare a inducțiilor embrionare.....	193
I. Inducerea mezodermului în cultură - metoda calotei animale.....	193
<i>Protocol experimental.....</i>	194
II. Inducția membrilor la păsări.....	197
<i>Protocol experimental.....</i>	197
III. Medii și soluții.....	200

Capitolul 5

Metode de evidențiere a produșilor genici.....	201
I. Hibridizarea <i>in situ</i>	201
A. Sonde de hibridizare.....	203
B. Fixarea, stocarea și permeabilizarea embrionilor.....	206
C. Hibridizarea.....	208
D. Tratamente post-hibridizare.....	208
E. Detectarea hibridizării.....	208
F. Martorii hibridizării.....	211
<i>Protocol experimental.....</i>	211
II. Tehnici imunohistochimice.....	216
A. Tipuri de anticorpi și metode imunohistochimice.....	216
B. Fixarea țesuturilor.....	227
C. Albirea embrionilor.....	231
D. Permeabilizarea țesuturilor.....	231
E. Restabilirea antigenității.....	232
F. Blocarea legării nespecifice.....	233
G. Imunohistochimia dublă.....	233
H. Martorii imunohistochimiei.....	233
<i>Protocol experimental-imunohistochimia în</i>	
<i>microscopia optică.....</i>	234
<i>Protocol experimental-imunohistochimia in toto.....</i>	236
<i>Protocol experimental-imunohistochimia în</i>	
<i>microscopia electronică.....</i>	238
III. Metode de detectare a proteinelor rapoarte.....	240
<i>Protocol experimental.....</i>	242
IV. Medii și soluții.....	243

Capitolul 6

Metode de identificare a apoptozei.....	247
I. Detectarea apoptozei pe baza morfologiei celulare.....	249
A. Detectarea apoptozei prin microscopia optică.....	249
<i>Protocol experimental.....</i>	249
B. Detectarea apoptozei prin microscopia electronică.....	250
<i>Protocol experimental.....</i>	251
II. Detectarea apoptozei prin colorare vitală.....	252
A. Albastru de Nile.....	253
<i>Protocol experimental.....</i>	253
B. Acridin orange.....	253
<i>Protocol experimental.....</i>	254
C. LysoTracker Red (LTR).....	254
III. Detectarea fragmentării ADN.....	255
A. Electroforeza.....	255
<i>Protocol experimental 1.....</i>	256

<i>Protocol experimental 2</i>	256
B. Metoda TUNEL.....	256
<i>Protocol experimental</i>	258
C. Metoda "Comet".....	259
IV. Detectarea fosfatidilserinei expuse.....	260
<i>Protocol experimental</i>	260
V. Detectarea lizozomilor și a vacuolelor autofagice.....	261
<i>Protocol experimental</i>	261
VI. Detectarea activității caspazei-3.....	261
<i>Protocol experimental – determinarea cantitativă a caspazei-3</i>	262
VII. Medii și soluții.....	264
Bibliografie.....	267

Tabel 1. Aparatură necesară

Spațiu	Caracteristici	Locul de achiziționare
Laborator de culturi celulare	Incubator, centrifugă, pipetă, etc.	Magazinul de echipament de laborator
Laborator de analiză de imagini	Microscop, computer, software de analiză de imagini	Magazinul de echipament de laborator
Laborator de analiză de imagini	Microscop, computer, software de analiză de imagini	Magazinul de echipament de laborator
Laborator de analiză de imagini	Microscop, computer, software de analiză de imagini	Magazinul de echipament de laborator
Laborator de analiză de imagini	Microscop, computer, software de analiză de imagini	Magazinul de echipament de laborator
Laborator de analiză de imagini	Microscop, computer, software de analiză de imagini	Magazinul de echipament de laborator
Laborator de analiză de imagini	Microscop, computer, software de analiză de imagini	Magazinul de echipament de laborator

Cel mai mare avantaj al acestei metode este faptul că permite o analiză rapidă și precisă a celulelor care suferă de apoptoză. În plus, această metodă este foarte ușor de utilizat și nu necesită echipament specializat. Totuși, este important să se țină cont de faptul că această metodă nu poate fi utilizată pentru a determina stadiul exact al apoptozei, ci doar pentru a identifica prezența acesteia.

În concluzie, această metodă este foarte utilă pentru a studia procesul de apoptoză în celulele umane și animale. Este important să se țină cont de faptul că această metodă nu poate fi utilizată pentru a determina stadiul exact al apoptozei, ci doar pentru a identifica prezența acesteia.

În concluzie, această metodă este foarte utilă pentru a studia procesul de apoptoză în celulele umane și animale. Este important să se țină cont de faptul că această metodă nu poate fi utilizată pentru a determina stadiul exact al apoptozei, ci doar pentru a identifica prezența acesteia.

CAPITOLUL

1

OBȚINEREA ȘI CULTIVAREA EMBRIONILOR

Din peste un milion de specii de animale, biologia dezvoltării s-a concentrat pe un număr foarte mic de organisme, cunoscute sub denumirea de "**organisme model**". Această alegere nu urmărește înțelegerea embriogenezei unui anumit organism, ci are ca scop folosirea lor, ca exemple ale dezvoltării tuturor speciilor.

Majoritatea cercetărilor de biologia dezvoltării sunt suportate financiar din fonduri medicale și scopul lor final este de fapt înțelegerea modului în care se dezvoltă organismul uman, chiar dacă acesta nu este scopul imediat al cercetătorilor.

Organismele model folosite în biologia dezvoltării sunt prezentate în tabelul 1.

Tabel 1. Organisme model

Specia	Denumire populară	Încadrarea sistematică
<i>Caenorhabditis elegans</i>	vierme	Nematoda, Phasimida
<i>Drosophila melanogaster</i>	musculița de oțet	Artrophoda, Insecta
<i>Danio rerio</i>	pește zebură	Chordata, Vertebrata, Osteichthyes
<i>Xenopus laevis</i>	broasca cu gheare	Chordata, Vertebrata, Amphibia
<i>Gallus domestica</i>	găină	Chordata, Vertebrata, Aves
<i>Mus musculus</i>	șoarece	Chordata, Vertebrata, Mammalia

Deși aceste organisme model nu acoperă întregul arbore filogenetic, distanța evolutivă dintre cele două nevertebrate și cele patru vertebrate este suficientă pentru a dovedi că orice aspect embrionar prezent la toate cele șase specii trebuie să fie foarte răspândit în lumea animală.

Cele șase organisme model au fost alese deoarece au unele avantaje experimentale (Tabel 2).

Numărul de embrioni obținuți de la fiecare specie este diferit. De la primele patru specii se pot recolta mii de ouă. Ouăle fecundate de găină nu se pot obține în laborator, însă pot fi procurate de la crescătoriile de păsări. Șoarecele este mai puțin prolific decât celelalte specii, dar de la o singură femelă se pot obține în jur de 12 embrioni.

Tabel 2. Avantajele și dezavantajele experimentale ale celor șase organisme model

	<i>C. elegans</i>	<i>Drosophila</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Xenopus</i>	<i>Gallus</i>	<i>Mus</i>
Număr de embrioni	mare	mare	mare	mare	scăzut	scăzut
Cost	scăzut	mediu	mediu	mediu	scăzut	ridicat
Accesibilitate	bună	bună	bună	bună	bună	redușă
Micromanipulare	limitată	limitată	satisfăcătoare	bună	bună	limitată
Experimente genetice	realizabile	realizabile	satisfăcătoare	nu	nu	realizabile
Cartarea genomului	realizată	realizată	curând	în viitor	în viitor	realizată

Costurile întreținerii acestor animale este un aspect foarte important, deoarece ritmul cercetărilor moderne necesită folosirea săptămânală sau zilnică a embrionilor. *C. elegans* este foarte ieftin, pentru că poate fi crescut pe medii solide cu agar, acoperite cu bacterii, stocurile genetice putând fi păstrate prin congelare. *Drosophila* este potențial ieftină, dar necesită camere cu umiditate și temperatură controlată și tehnicieni pentru a menține diferite stocuri genetice. Musculițele nu pot fi conservate prin înghețare. Peștii zebură necesită acvarii costisitoare și menținerea stocurilor pe scară largă. Costurile unui astfel de laborator sunt destul de ridicate și similare celor de la *Drosophila*. *Xenopus* are de asemenea nevoie de acvarii, deși acestea pot fi tradiționale și mai puțin sofisticate decât cele de la peștele zebură. Întreținerea este relativ ieftină, deoarece nu sunt folosite pentru experimente genetice și în consecință există puține stocuri de menținut. Păstrarea embrionilor de găină este foarte ieftină și necesită doar un incubator. Dacă însă în laborator se realizează încrucișări genetice sau sunt necesare stadii foarte timpurii este nevoie de o unitate de încrucișare a gănilor, care poate fi costisitoare. Șoarecii necesită costurile cele mai mari, datorită logisticii împerecherii și facilităților experimentale. Embrionii și spermatozoizii de șoarece pot fi congelați, reducând astfel costurile menținerii stocurilor.

Accesibilitatea se referă la faptul că toate cele șase specii sunt disponibile pentru experimentare pe tot parcursul anului. Fără această proprietate ele nu ar fi fost alese ca organisme model. Embrionii pot fi obținuți prin disecție, însă multe experimente implică manipularea embrionilor și menținerea lor ulterioară *in vivo*, pentru a observa consecințele experimentului. Din acest punct de vedere organismele cu fecundare externă de tipul *Xenopus* și *Danio rerio* sunt cele mai convenabile. Zigoții de *Drosophila* sunt eliberați la scurt timp după fecundare. Embrionii de *C. elegans* sunt disecați din femela gestantă în timpul segmentării. Embrionii de găină suferă segmentarea în tractul reproducător femel și în momentul depunerii oului se află în stadiul de discoblastulă bistratificată, ce conține ~60.000 celule. După acest stadiu, embrionii de găină se pot accesa ușor printr-un orificiu tăiat în coaja oului. După micromanipulare ei supraviețuiesc perfect, dacă orificiul este resigilat cu bandă izolatoare și sunt plasați în incubator. Dintre cele șase organisme model, șoarecii sunt cel mai greu de accesat. În primele patru zile, embrionii pot fi recoltați prin spălarea tractului reproducător și cultivați *in vitro*. După această perioadă, are loc implantarea în uter și embrionii devin dependenți de nutriția placentară. Este foarte dificilă cultivarea embrionilor pre-implantaționali, astfel încât ei să ajungă până în stadiile post-implantaționale. Embrionii post-implantaționali timpurii pot fi cultivați *in vitro* doar

1-2 zile. Cu toate acestea, rudimente de organe atât de la embrionii de șoarece cât și de la cei de găină, cultivate pentru perioade lungi de timp, se diferențiază corespunzător.

Micromanipularea chirurgicală implică îndepărtarea unei singure celule, a unui fragment de țesut, grefarea unui explant într-o altă poziție sau în alt embrion precum și injectarea celulelor individuale cu diferite substanțe. Toate aceste operații se realizează foarte ușor la *Xenopus*. Datorită dimensiunii mari a oului de amfibian, micromanipularea poate fi realizată manual, la microscopul de disecție, microinjectările necesitând echipamente simple și relativ ieftine. O micromanipulare rezonabilă se poate realiza de asemenea la peștele zebra și găină, în special în stadiile mai avansate. Celelalte organisme model sunt mai puțin favorabile acestui aspect. Embrionii de *C. elegans* și *Drosophila* sunt mici și înconjurați de învelișuri externe. Embrionii de șoarece sunt de asemenea mici în stadiile pre-implantaționale și greu de cultivat în stadiile post-implantaționale.

Embrionii de *C. elegans* și *Danio rerio* au un avantaj particular, acela de a fi transparenți și astfel este mai ușor de urmărit deplasările celulare *in vivo*.

Experimentele genetice la *Drosophila* sunt foarte sofisticate și cu o tradiție îndelungată, înainte ca muscușia să fie adoptată ca model pentru studierea dezvoltării. Ciclul de viață scurt, de 2 săptămâni și ușurința cu care se pot păstra un număr mare de animale au fost aspectele decisive în această alegere. *C. elegans* este de asemenea favorabil studiilor genetice, datorită ciclului de viață scurt și ușurinței de a fi păstrat în număr mare. Genetica la șoarece a fost practică de mult timp, însă nu a atins gradul de dezvoltare de la *Drosophila*, în parte datorită dificultății de manipulare a mutațiilor letale și costurilor uriașe de a păstra un număr mare de animale, necesare pentru trierea mutațiilor. Cu toate acestea, capacitatea de a realiza "knock-out" pentru anumite gene a devenit o tehnică foarte importantă. *Danio rerio* a fost introdus recent ca organism de laborator, astfel încât nu există încă o tehnologie sofisticată. Referitor la numărul de indivizi și durata unui ciclu de viață (4 luni) este inferior nevertebratelor dar convenabil pentru vertebrate. *Xenopus laevis* nu a fost luată niciodată în serios pentru studiile genetice, datorită ciclului de viață lung (durează cel puțin un an pentru a atinge maturitatea sexuală). Cu toate acestea, specia înrudită *Xenopus tropicalis* atinge maturitatea sexuală la 3-5 luni și poate reprezenta "organismul de vis" din punct de vedere genetic. În tabelul 3 sunt prezentate diferite aspecte comparative la *Xenopus laevis* și *Xenopus tropicalis*.

Tabel 3. Aspecte comparative între *X. laevis* și *X. tropicalis*

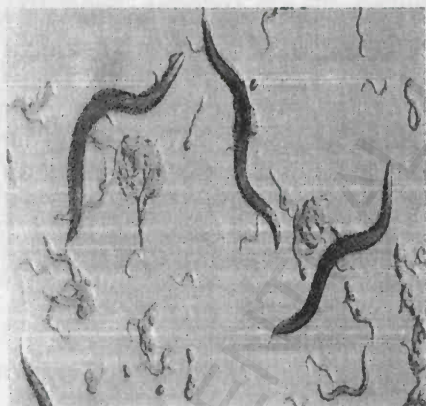
Aspect	<i>Xenopus laevis</i>	<i>Xenopus tropicalis</i>
Ploidie	Alotetraploid	Diploid
Număr haploid de cromozomi	18 cromozomi	10 cromozomi
Dimensiunea genomului	3,1 X 10 ⁹ pb	1,7 X 10 ⁹ pb
Temperatura	16-22°C	22-32°C
Dimensiunea adulților	10 cm	4-5 cm
Dimensiunea ouălelor	1-1,3 mm	0,7-0,8 mm
Numărul de ouă depuse	300-1000	1000-9000
Atingerea maturității sexuale	8-12 luni	3-4½, luni

(După Hirsch și al.,2002) Pb=perechi de baze

Secvențierea genomului celor șase organisme model este prioritară pentru biologia dezvoltării. Dacă un cercetător dorește să identifice într-un anumit organism o genă omoloagă unei gene cunoscute, clonează gena, proces care necesită un timp și

efort considerabil. În momentul în care inventarierea completă a genelor și cartarea lor este realizată orice genă poate fi obținută dintr-un depozit central. Secvențierea genomului s-a realizat complet pentru *C. elegans*, *Drosophila* și șoarece. Din păcate, *Xenopus laevis* și *Danio rerio* sunt pseudotetraploide. Aceasta înseamnă că au suferit o duplicație extragenomică prin care și-au dublat numărul de gene. Tetraploidizarea de la peștele zebură este ancestrală, astfel încât copiile duplicate au căpătat funcții diferite. La *Xenopus laevis* acest proces este mai recent și perechile de gene au funcții aproape similare. În general, existența mai multor gene este nefavorabilă, deoarece necesită un efort mai mare de secvențiere și mai multă redundanță funcțională. Din fericire, *Xenopus tropicalis* este diploid.

Relevanța se referă la faptul că nu există un singur organism care să poată fi folosit pentru studierea tuturor evenimentelor și aspectelor embrionare, deoarece fiecare model embrionar se raportează la o anumită specie. Generalizarea unor mecanisme embrionare se realizează când acestea sunt studiate în mai multe organisme, care se dezvoltă diferit, însă prezintă unele aspecte comune. Studiile de laborator au evidențiat că nu există un animal ideal și că fiecare organism model are avantaje și dezavantaje. Șoarecele și găina sunt amniote. Aceasta înseamnă că ele apar mult mai asemănătoare omului decât celelalte organisme. Din acest motiv, șoarecele și găina au împărțit de-a lungul anilor fondurile cercetărilor medicale. Cu toate acestea, la nivel molecular, alte organisme sunt mult mai asemănătoare omului decât cele două de mai sus.



Caenorhabditis elegans

Nematodele au fost cultivate în laborator încă din 1944, când Margaret Briggs Gochnauer a izolat și cultivat hermafrodiți de *Caenorhabditis briggsae*. În 1970, cercetătorul Sydney Brenner a propus investigarea amănunțită a nematodului transparent *C. elegans*, care în prezent este printre cele mai folosite organisme model în biologia dezvoltării.

Nematodul *C. elegans* este unul din cele mai simple metazoare, conține un număr fix de celule somatice (959) și un genom mic (100 Mb), secvențiat complet.

Folosirea sa ca organism model depinde de următoarele avantaje experimentale:

- ☺ Simplitate anatomică. Deși are țesuturi și organe întâlnite la organismele complexe (de tipul mușchilor, sistemului nervos, gonade, epidermă și tract

gastrointestinal), acestea sunt foarte simple. De exemplu, există 302 neuroni și 95 mușchi corporali;

- ☺ Ciclu de viață scurt (3 zile) (Fig.1). Dezvoltarea embrionară durează 14 ore, după care larva eclozează. Animalul trece prin patru stadii larvare (L1-L4), separate prin perioade de letargie, în care elimină vechea cuticulă. În condiții de densitate populațională mare și hrană limitată, larvele în primul stadiu pot intra într-un ciclu de dezvoltare alternativ, numit stadiul rezistent ("dauer¹"), în care pot supraviețui până la patru luni. Hermafrodiții pot fi identificați prin prezența vulvei, în timp ce masculii prezintă o coadă în formă de evantai cu o structură caracteristică (Fig.2);

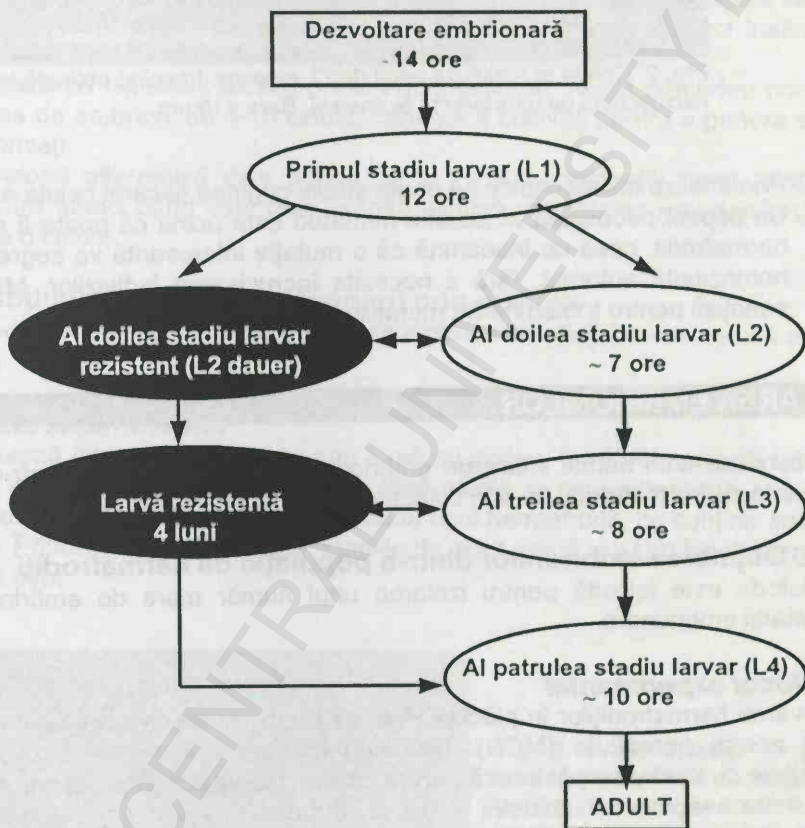


Fig.1. Ciclu de viață la *C. elegans*.

- ☺ Embrioni, larve și adulți transparenti, care pot fi observați *in vivo*, în microscopia optică și de interferență Nomarski²; Embrionii pot fi izolați din uter și din anvelopa vitelină fără a fi distruși;

¹Rezistent, germ. Stadiu în care larvele nu se hrănesc și nu se reproduc.

²Inventat de George Nomarski în 1952. Se folosește pentru observarea și măsurarea grosimii embrionilor fără contrast sau cu un contrast slab. Structurile observate la acest tip de microscop apar în relief.

- ☺ Embriogeneza urmează un model precis, specific de specie, care este repetat identic în fiecare generație;

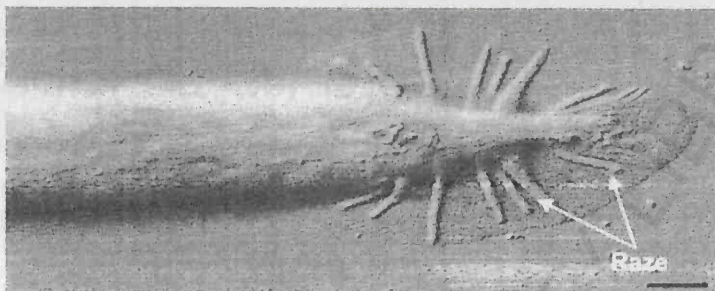


Fig. 2. Coada la masculul adult de *C. elegans*. Imagine obținută la microscopul de interferență Nomarski. Bara = 10 μ m.

- ☺ Prin analize microscopice se poate stabili originea fiecărei celule a corpului;
- ☺ Un aspect neobișnuit al acestui nematod este acela că poate fi menținut ca hermafrodit, ceea ce înseamnă că o mutație interesantă va segrega în stare homozigotă automat, fără a necesita încrucișarea indivizilor. Masculii sunt esențiali pentru transmiterea mutațiilor între linii;

I. IZOLAREA EMBRIONILOR

Obținerea unui număr mare de embrioni se poate realiza fie dintr-o populație sincronizată de hermafrodiți, fie prin disecție (Edgar și Wood, 1993).

A. Obținerea embrionilor dintr-o populație de hermafrodiți

Metoda este folosită pentru izolarea unui număr mare de embrioni aflați în diferite stadii embrionare.

Protocol experimental

1. Cultivarea hermafrodiților în plăcuțe Petri de 6 cm, acoperite cu mediu de creștere solid pentru nematode (MCN). Nematodele sunt hrănite cu *Escherichia coli*. Plăcuțele cu mediu se păstrează pentru câteva zile la temperatura camerei, pentru a permite evaporarea lichidului în exces, după care se înșămânțează cu câteva picături de suspensie bacteriană, sterilă, fără a deteriora suprafața agarului. Se incubează la temperatura camerei, peste noapte, înaintea plasării nematodelor.
2. Transferul nematodelor sub stereomicroscop, folosind fire de platină de 1-3 cm, lipite la vârful unei pipete Pasteur. Dacă după transfer animalul nu este activ el a fost distrus în timpul manipulării. Se evită alterarea suprafeței de agar în timpul transferului. Linia sălbatică N2 se reproduce la temperaturi cuprinse între 12-26°C, însă numărul maxim de progenituri (250-350) se obține la 20°C. Intervalul de timp după care se obține o nouă generație este de 50 de ore la 25°C, 70 de ore la 20°C și 100 de ore la 15°C. Plăcile stoc pot fi păstrate la 15°C cel puțin două luni. După aproximativ două generații pe o placă de cultură mică, nematodele epuizează bacteriile și intră în stadiul de larvă "dauer", care nu se hrănește și poate supraviețui câteva luni, dacă placa nu devine prea uscată.

3. Recoltarea embrionilor prin spălarea viermilor gravizi cu 1 ml tampon M9.
4. Se adaugă 0,5 volume de hipoclorit de sodiu alcalin, proaspăt preparat dintr-un amestec 2 părți 4 M NaOH : 3 părți 4-6% NaOCl. În timp ce adulții se dizolvă (5 minute, la temperatura camerei), cele mai rezistente ouă eclozează și larvele încep să se deplaseze. Ele se hrănesc în ziua următoare. Larvele sunt transferate într-o placă însămânțată proaspăt. Operația se supraveghează la microscop.
5. Centrifugare ușoară a embrionilor eliberați (2 min, 350 g), spălare cu mediu M9 steril și recentrifugare de încă două ori. Se colectează embrionii într-un volum minim de mediu, folosind pipeta Pasteur.
6. Plasarea embrionilor pe o plăcuță proaspătă, fără bacterii și incubare peste noapte. *Fără sursă de hrană animalele sunt blocate în primul stadiu larvar.*
7. Pentru a obține o populație de embrioni cu dezvoltare sincronă, se spală larvele de pe placă, lăsând embrionii neeclozați pentru a fi recultivați pe plăci însămânțate. Dezvoltarea embrionară este monitorizată la stereomicroscop.
8. Se tratează cu hipoclorit alcalin primii adulți gestați. Acest procedeu conduce la obținerea de embrioni de 4-16 celule, care pot fi cultivați pentru a genera embrioni mai avansați.

O metodă alternativă este aceea de a folosi hermafrodiți tineri, dintr-o linie mutantă, care atunci când este bine hrănită elimină majoritatea embrionilor înaintea stadiului de 8 celule.

B. Obținerea embrionilor timpurii prin disecție

Metoda se folosește pentru obținerea embrionilor aflați într-un anumit stadiu de dezvoltare.

Protocol experimental

1. Se plasează într-o sticlă de ceas sau lamă cu godeu, 5-10 hermafrodiți tineri, bine hrăniți, într-un volum mic de soluție salină sterilă și se secționează în jumătate, lângă vulvă. În figura 3 se remarcă gonada unui hermafrodit, ce conține embrioni și ovocite. Printre embrionii eliberați, stadiile de zigot, două și patru blastomere se pot distinge ușor.

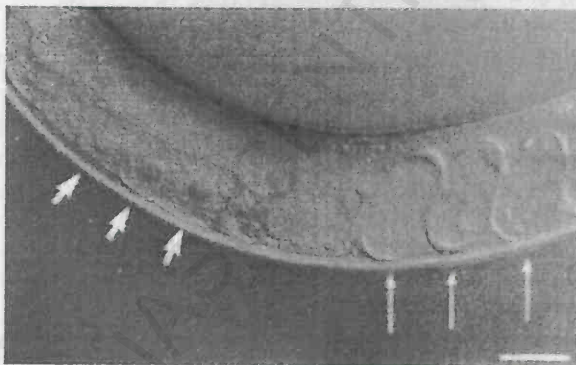


Fig. 3. Brațul anterior al gonadei unui hermafrodit de *C. elegans*, ce conține embrioni în uter (săgețile lungi) și ovocite (săgeți scurte). Imagine obținută la microscopul de interferență Nomarski. Bara=20 μm.

2. Se transferă individual stadiile embrionare pe lame, pentru observare sau în alte recipiente pentru tratamente ulterioare. Embrionii timpurii pot fi înghețați la 4-10°C, până la cel puțin 2 ore, pentru blocarea dezvoltării într-un anumit stadiu, în timp ce

ceilalți sunt colectați și cultivați în placi cu mediu proaspăt, unde la temperatura camerei își continuă embriogeneza sincron.

II. PERMEABILIZAREA EMBRIONILOR

Manipularea experimentală a embrionilor necesită permeabilizarea cojii chitinoase și a anvelopei viteline. Permeabilizarea embrionilor poate fi realizată prin două metode: (A) cu hipoclorit de sodiu, în cazul unui număr mare de embrioni; (B) cu chitinază, în cazul unui număr mic de embrioni.

A. Permeabilizarea embrionilor cu hipoclorit de sodiu

Zigoții sunt permeabili, deoarece coaja nu este complet întărită. *Hipocloritul de sodiu înmoaie embrionii și îi face mai transparenți.*

Protocol experimental

1. Plasarea embrionilor într-o lamă cu godeu sau tub de microcentrifugă (Eppendorf). Se adaugă un volum egal de soluție NaOCl (hipoclorit de sodiu) diluată 1:9.
2. După un minut se adaugă un volum egal de 1 mg/ml albumină serică bovină (BSA³) în soluție salină.

B. Permeabilizarea embrionilor cu o soluție de chitinază

Pentru un număr mic de embrioni, coaja chitinoasă și anvelopa vitelină pot fi îndepărtate prin tratament cu chitinază, urmat de pipetare. Acești embrioni nuzi, cultivați în mediu de creștere embrionar (MCE) vor continua diviziunile celulare și diferențierea până în stadiul de 550 celule, deși ei nu suferă o morfogeneză normală.

Protocol experimental

1. Se pregătește o lamă cu două godeuri. În primul godeu se pipetează mediu de cultură embrionar iar în al doilea 100 μ l NaOCl diluat. Între cele două godeuri se plasează două picături, de câte 30 μ l fiecare, una cu mediu de cultură embrionar (sau 1 mg/ml BSA în soluție salină) și a doua cu soluție salină (Fig.4).
2. Plasarea embrionilor în primul godeu cu mediu de cultură embrionar.
3. Se transferă embrionii în stadiul dorit (într-un volum minim de 10-20 μ l) în al doilea godeu, ce conține 100 μ l NaOCl diluat, unde se lasă 3 minute. Între timp se aspiră lichidul din primul godeu, se usucă și se pune 15-20 μ l soluție chitinază, peste care se așează ulei de silicon (3 μ l). *Uleiul previne evaporarea și concentrarea mediului.*
4. Spălarea rapidă a embrionilor prin cele două picături, dintre godeuri.

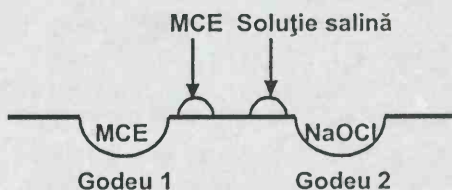


Fig. 4. Aspectul lamei necesare pentru permeabilizarea embrionilor cu chitinază.

³ Bovine Serum Albumin

5. Se transferă embrionii în soluția de chitinază, unde se lasă până la 8 minute. Embrionii timpurii se rotunjesc, coaja este dizolvată și în final sunt eliberați. Dacă digestia nu lucrează bine se încearcă nematode mai bătrâne, care fac coji mai subțiri.
6. Se spală embrionii cu mediu de cultură embrionar.

C. Îndepărtarea anvelopei viteline

Se realizează prin aspirarea individuală a embrionilor prin capilare subțiri. Dacă coaja chitinoasă este digerată bine și pipeta are diametrul corect, durează 1-2 minute pentru a obține 100 de embrioni.

III. IDENTIFICAREA ȘI OBSERVAREA STADIILOR EMBRIONARE

Pentru observare, embrionii se transferă în camera de incubare, ce conține 30 μ l mediu de cultură embrionar (dacă se folosesc lame imunologice se acoperă cu 3 μ l ulei de silicon). Pentru incubarea peste noapte se păstrează într-o cameră umedă. Camera de incubare, poate fi observată la microscopul inversat și este reprezentată de o lamă de plastic sau aluminiu, cu dimensiuni de 25 X 75 X 6 mm, ce conține un orificiu central de 16 mm. Orificiul central se acoperă cu două lamele, una dedesubt, lipită cu silicon și alta, deasupra, peste embrion, lipită cu ulei de silicon.

Stadiul 1: Zigot

În cursul acestui stadiu pronucleii migrează unul spre celălalt (Fig.5A-B).

Stadiul 2: Două blastomere (19 minute).

O blastomere anterioară (AB) și una posterioară (P_1), precursora a liniei germinale (Fig.5C).

Stadiul 3: Patru blastomere (26 minute)

Blastomerele sunt notate: ABa (anterioară), ABp (posterioară), P_2 , EMS (Fig.5D).

Stadiul 4: 8 blastomere (44 minute)

Blastomerele sunt notate: 4 blastomere AB, și câte una MS, E, C, P_3 (Fig.5E).

Stadiul 5: Începutul gastrulării

După formarea blastomerei P_4 , cele două celule fiice ale blastomerei E migrează de pe partea ventrală în interiorul embrionului. Nu există blastocel, fiind prezente doar două spații intercelulare mici. În timpul embriogenezei, descendența celulei E formează tubul digestiv alcătuit doar din 20 de celule (Fig.5F).

Stadiul 6: Îndoirea embrionului (stadiul de virgulă)

Celulele hipodermale au migrat în jurul embrionului (Fig.5G).

Stadiul 7: Sfârșitul embriogenezei

Organogeneza este încheiată și embrionul va ecloza din coaja chitinoasă, pentru a parcurge primul stadiu larvar (Fig.5H).

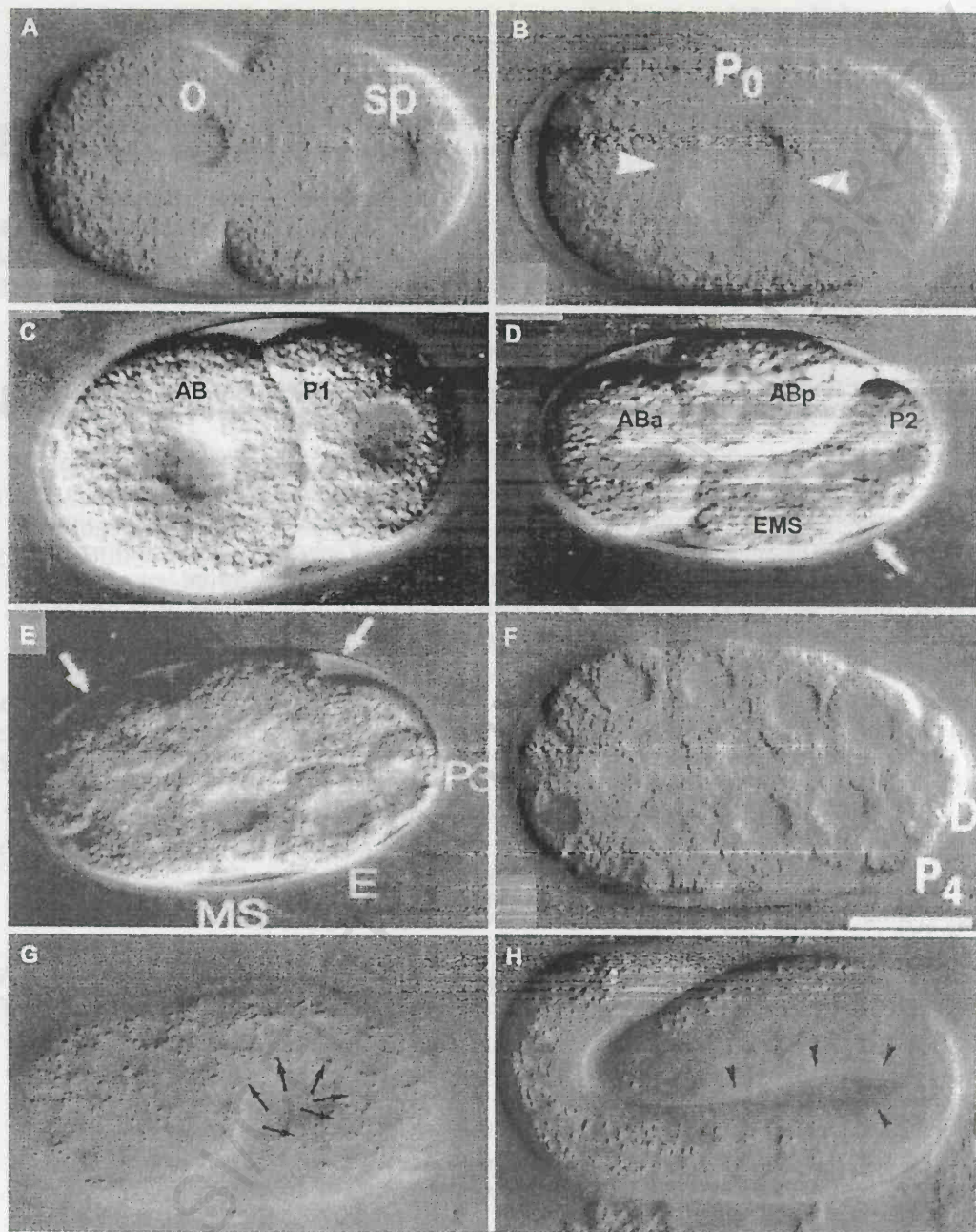


Fig. 5. Dezvoltarea embrionară la *C. elegans*. **A**-Migrarea pronucleului ovocitar (o) către pronucleul mascul (sp). **B**-Fuziunea pronucleilor. **C**-Două blastomere. **D**-Patru blastomere. **E**-Opt blastomere. **F**-Începutul gastrulării. **G**-Stadiul de virgulă în care se remarcă cele șase celule hipodermale migrate în jurul embrionului (săgeți). **H**-Embrion înaintea ecloziunii. Imagini obținute la microscopul de interferență Nomarski. Săgețile indică anelopa vitelină. Bara =10 μ m (A-D); Bara =5 μ m (E-H).

IV. MEDII ȘI SOLUȚII

■ *Mediu de creștere solid pentru nematode (MCN)*

Se autoclavează amestecul: 975 ml apă; 3 g NaCl; 17 g agar; 2,5 g peptonă; 1 ml colesterol (5 mg/ml în etanol), după care se adaugă steril 1 ml 1 M CaCl_2 ; 1 ml 1 M MgSO_4 ; 25 ml 1 M fosfat de potasiu, pH 6. Se amestecă după fiecare adăugare.

■ *Mediul de creștere embrionar (MCE)*

50 mg PVP-40 dializat în apă și liofilizat; 588 μl 1 M NaCl; 252 μl 1 M KCl; 1 ml 0,25 M HEPES pH 7,4; 1 ml 5 mg/ml inulin; 600 μl soluție de aminoacizi Grace⁴ (Sigma), 1,97 ml H_2O ; 4 ml ser fetal bovin, tratat termic; 100 μl soluție penicilină-streptomicină⁵ (Sigma); 100 μl 100 mg/ml galactoză; 100 μl amestec baze azotate (100 mg adenină, 10 mg ATP, 3 mg guanină, 3 mg hipoxantină, 3 mg timină, 3 mg xantină, 3 mg uridină, 5 mg riboză, 5 mg deoxiriboză, 100 ml H_2O) (Sigma); 100 μl 14 mg/ml L-glutamină proaspăt preparată; 50 μl vitamine BME (Sigma); 40 μl 0,5 M Na_2HPO_4 ; 20 μl 1 M MgSO_4 ; 20 μl 14 mg/ml acid piruvic proaspăt preparat; 10 μl sirop acid lactic (Sigma); 50 μl vitelus de găină (diluat 1:1 în H_2O). Se amestecă și se incubează pe gheață câteva ore, după care se centrifughează și se filtrează steril (filtru Millipore de 0,2 μm). Se păstrează la 4°C până la o lună.

■ *Soluție chitinază*

3 mg/ml chitinază (Sigma), 10 mg/ml chimotripsină (Sigma), în soluție salină embrionară.

■ *Soluție salină embrioni*

118 mM NaCl; 40 mM KCl; cu sau fără 100 $\mu\text{g/ml}$ tetramisole.

■ *Soluție NaOCl diluată 1:9*

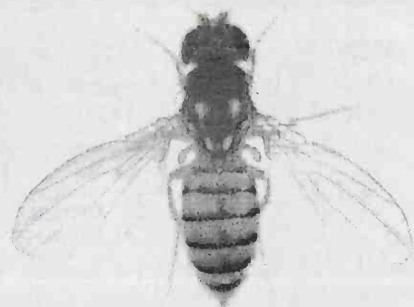
O parte 4-6% NaOCl comercial, nouă părți soluție salină. Diluția este stabilă 3 ore pe gheață.

■ *Tampon M9*

3 g KH_2PO_4 ; 6 g Na_2HPO_4 ; 1 ml 1 M MgSO_4 ; 1 l apă distilată.

⁴Elaborat de T. D. C. Grace în 1962.

⁵Conține 5000 unități penicilină și 5 mg streptomicină per ml, dizolvate în 0,9% NaCl. Soluție sterilă.



Drosophila melanogaster

Drosophila reprezintă unul din organismele model favorite al cercetărilor de biologia dezvoltării din următoarele motive:

- ☺ Poate fi menținută ușor în laborator;
- ☺ La 25°C embriogeneza este completă în 22 ore iar o nouă generație se obține în 9 zile (Fig.6);
- ☺ Nu există recombinare meiotică la masculii;
- ☺ Exoscheletul furnizează un număr mare de aspecte externe, de tipul perilor, venelor aripilor, ochii compuși, care pot fi afectate de mutații. Din acest motiv, fenotipul mutant poate fi identificat ușor prin observarea la stereomicroscop.
- ☺ Un număr surprinzător de mare de procese embrionare sunt conservate între insecte și vertebrate. De exemplu, axa embrionară dorso-ventrală la *Drosophila* și vertebrate este modelată de gradientii opuși ai proteinelor Decapentaplegic la nevertebrate și Short gastrulation la vertebrate, deși orientarea axei este inversă. Proteinele Hedgehog de la insecte și Sonic hedgehog de la vertebrate au roluri similare.
- ☺ *Drosophila* are doar ~15.000 de gene, mai puține decât *C. elegans*, dar de două ori mai multe au omologie clară cu cele umane. În plus, 197 din 287 de gene ale maladiilor umane au omologi la *Drosophila*.
- ☺ Unul din cele mai importante avantaje este capacitatea de a realiza selecții genetice (așa numitul "genetic screening") la scară mare, pentru mutații ce afectează un anumit proces. Avantajul metodei este acela că furnizează un mijloc corect pentru identificarea genelor ce funcționează într-un anumit proces, în timp ce mutantele însăși sunt foarte valoroase pentru disecarea funcției unei gene.
- ☺ *Drosophila* are un singur dezavantaj, acela că stocurile trebuie menținute continuu în laborator.

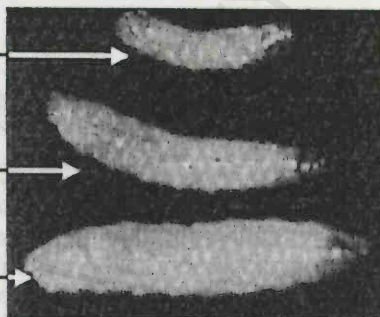
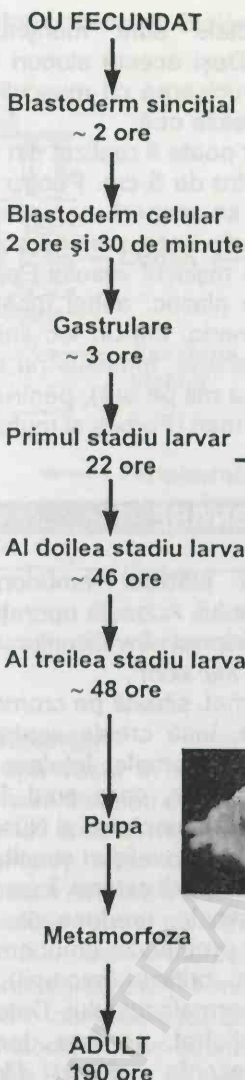


Fig.6. Ciclul de viață la *Drosophila*.

I. RECOLTAREA EMBRIONILOR

Mai multe perechi de musculițe se păstrează în borcane cu mediu nutritiv solid. Pentru a produce musculițe sănătoase, de la care se recoltează un număr mare de embrioni, este necesară respectarea câtorva condiții.

Pentru a evita culturile aglomerate, ce determină obținerea de musculițe mici, întârziate în creștere și cu fecunditate scăzută, stocurile parentale se transferă în borcane cu mediu proaspăt la 1-3 zile, în funcție de numărul de ouă depuse. Niciodată nu trebuie să fie atât de multe larve în borcan, încât mediul să devină apos.

Stocurile de mutante recesive letale sunt menținute prin cromozomi compensatori⁶ ("balancer chromosomes"). Deși aceste stocuri sunt sănătoase și se reproduc fără probleme se recomandă încrucișarea cu musculițe sălbatice, pentru a produce părinți viguroși, de la care se recoltează ouă.

Recipientul pentru depunerea ouălelor poate fi realizat din orice tip de container. Se poate folosi un vas de plastic cu diametru de 5 cm. Pentru ventilație eficientă se realizează un orificiu mic la fundul vasului și se acoperă cu o plasă fină.

Se închid 100-200 de musculițe în aceste vase, care se acoperă cu o placă Petri de 5 cm, ce conține mediu nutritiv solid. În mijlocul vasului Petri se plasează puțină pastă de drojdie. Se inversează vasul de plastic, astfel încât vasul Petri să vină dedesubt. Musculițele sunt plasate la întuneric, într-un loc liniștit, la 25°C. Ele vor depune ouă în mediu solid. Când sunt deranjate, femelele nu mai depun ouă. Dacă este necesar un număr mare de ouă (câteva mii pe oră), pentru extracție de proteine sau acizi nucleici se folosesc recipiente mai mari (Forbes și Ingham, 1993).

II. OBSERVAREA STADIILOR EMBRIONARE

Pentru observarea și identificarea stadiilor embrionare este necesară îndepărtarea chimică sau mecanică a corionului. Această operație poate fi adaptată în funcție de numărul de embrioni. Îndepărtarea învelișurilor embrionare nu este necesară dacă se folosesc adulți cu mutația *klarsicht*⁷.

klarsicht este o mutație cu efect maternal, situată pe cromozomul 3, care nu are nici un efect asupra viabilității embrionare, însă crește contrastul dintre vitelus și citoplasma embrionilor. Deși mutația nu este complet înțeleasă, fenotipul pare a fi datorat reducerii numărului de picături lipidice, care sunt încorporate în cursul celularizării în partea bazală a blastodermului (Wieschaus și Nüsslein-Volhard, 1986).

La sfârșitul ovogenezei sunt produse două învelișuri ovocitare - anvelopa vitelină și corionul - care au rolul de a proteja oul de factorii externi, în momentul oviposiției.

Corionul este format din straturi distincte, produse de celulele foliculare. El facilitează schimbul de gaze (O_2 și CO_2) și protejează embrionul de deshidratare. În regiunea anterioară a corionului există un orificiu (micropil), ce permite accesul spermatozoidului. Datorită oviposiției într-un substrat, pe fața dorsală anterioară sunt prezente două filamente respiratorii, cunoscute și sub denumirea de apendici corionici. După eliminarea din ovar, pe suprafața corionului apar imprimate celulele foliculare (Fig.7).

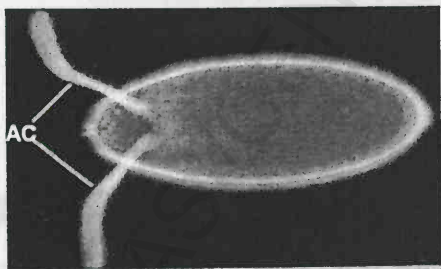


Fig.7. Aspectul dorsal al corionului la *Drosophila*. AC-apendici corionici

În figura 8 este prezentată schema învelișurilor ovocitare la sfârșitul ovogenezei și în embriogeneză.

Se va prezenta metoda prin care se realizează decorionarea individuală a

⁶Cromozomi cu unul sau mai multe segmente inversate, care blochează recombinarea.

Se folosesc pentru menținerea mutațiilor letale, fără selecție.

⁷Clar, limpede, germ.

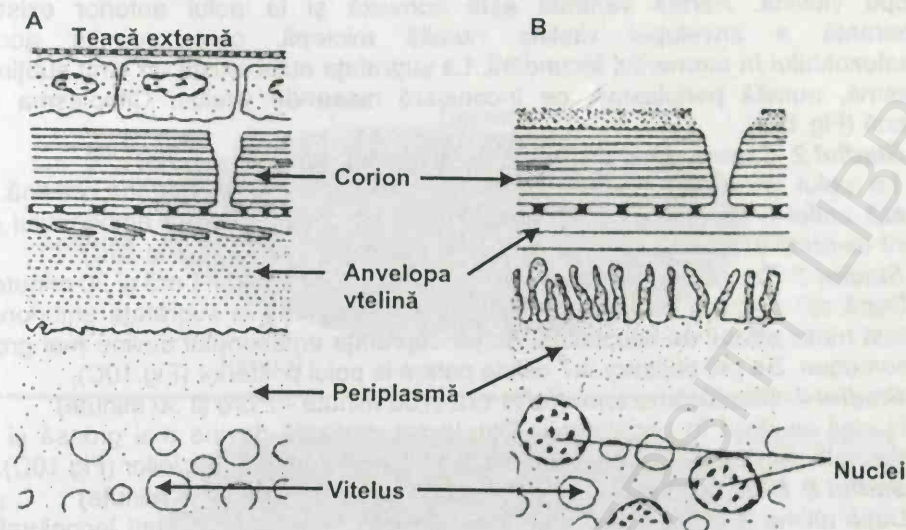


Fig.8. Schema structurii învelișurilor ovocitare la sfârșitul ovogenezei (A) și în embriogeneză (B).

Protocol experimental

1. Se stropește cu apă vasul în care musculițele au depus ouă și se detașează embrionii cu o pensulă fină sau cu un ac spatulat.
2. Se transferă câte un embrion în godeul unei lame, în care s-a pus în prealabil soluție Ringer (Fig.9). Se răsucesc cu acul spatulat embrionul, pentru îndepărtarea excesului de mediu nutritiv sau drojdie.
3. Se îndepărtează soluția Ringer cu hârtie de filtru și se înlocuiește cu o soluție 7,5% hipoclorit de sodiu. Se urmărește la microscop dizolvarea corionului (~4 minute).
4. În momentul în care corionul este dizolvat se îndepărtează hipocloritul de sodiu și se înlocuiește cu soluție Ringer.
5. Se fixează embrionii 20 minute cu 4% paraformaldehidă în soluție Ringer.
6. Se îndepărtează fixatorul și se spală cu soluție Ringer de două ori câte 5 minute fiecare spălare.
7. Embrionii se montează în 80% glicerol și se observă la microscop pentru identificarea stadiilor embrionare.



Fig.9. Embrion de *Drosophila* acoperit de corion, observat la stereomicroscop. Mărire inițială X14.

În figurile 10-13 sunt prezentate și caracterizate stadiile embrionare așa cum apar la microscopul optic, după îndepărtarea corionului. Descrierea stadiilor embrionare se bazează pe observațiile realizate de Eric Wieschaus și Christiane Nüsslein-Volhard și corespunde unei temperaturi de 22°C.

Stadiul 1: Zigot (0 - 15 minute)

Oul care măsoară ~0,5 mm lungime și 0,2 mm grosime este înconjurat de anvelopa vitelină. Partea ventrală este convexă și la polul anterior există o protuberanță a anvelopei viteline numită micropil, care permite accesul spermatozoidului în momentul fecundării. La suprafața oului există un strat subțire de citoplasmă, numită periplasmă, ce înconjoară masa de vitelus. Citoplasma este omogenă (Fig.10A).

Stadiul 2: Segmentare timpurie (15 minute - 1 oră și 20 minute)

La polul posterior, citoplasma se contractă față de membrana vitelină. Se formează astfel o citoplasmă clară numită "plasmă polară". Restul embrionului este acoperit de un strat foarte subțire și neregulat de citoplasmă clară (Fig.10B).

Stadiul 3: Formarea celulelor polare (1 oră și 20 minute - 1 oră și 30 minute)

După opt diviziuni nucleare, nucleii încep să migreze la suprafața embrionului. Din acest motiv stratul de citoplasmă de pe suprafața embrionului devine mai gros și mai neomogen. Se pot observa 3-7 celule polare la polul posterior (Fig.10C).

Stadiul 4: Blastoderm sincițial (1 oră și 30 minute - 2 ore și 30 minute)

Nucleii se divid în periplasmă. Citoplasma corticală devine mai groasă și mai clar delimitată de vitelus. Începe formarea membranelor în jurul nucleilor (Fig.10D).

Stadiul 5: Blastoderm celular (2 ore și 30 minute - 3 ore și 15 minute)

După ultima diviziune de segmentare, nucleii se alungesc și sunt înconjurați de o membrană. Stratul celular devine gros și clar delimitat de vitelus. Nucleii ventrali se celularizează mai rapid decât cei dorsali. Celulele polare pot fi distinse clar. Ele sunt rotunde și așezate în afara blastodermului, la polul posterior (Fig.11A).

Stadiul 6: Gastrulare timpurie - formarea cutei ventrale (3 ore și 15 minute - 3 ore și 35 minute)

Gastrularea începe în momentul în care nucleii de pe fața ventrală a embrionului s-au celularizat. Se formează o cută ventrală, ca o fisură longitudinală de-a lungul liniei mediene ventrale, pe 20-80% din lungimea embrionului. Celulele din vecinătatea anterioară și posterioară a cutei ventrale se îngustează. Se formează o placă posterioară, ce va purta celulele polare către regiunea dorsală a embrionului. Cuta cefalică devine vizibilă ca o invaginare laterală, oblică. Stratul celular dorsal este inițial foarte gros și columnar (Fig.11B).

Stadiul 7: Invaginarea intestinului mediu (3 ore și 35 minute - 3 ore și 45 minute)

Cuta cefalică este mai adâncă și vizibilă. Placa posterioară a intestinului mediu este paralelă cu axa lungă a embrionului, ceea ce determină deplasarea celulelor polare pe partea dorsală. Invaginarea anterioară a intestinului mediu poate fi identificată la capătul anterior al cutei ventrale. Sfârșitul acestui stadiu este caracterizat de dispariția celulelor polare în invaginarea posterioară a intestinului mediu. Cuta cefalică este înclinată și formează un unghi mai adânc cu axa lungă a embrionului. Cuta dorsală posterioară este foarte adâncă și se curbează lateral, către capătul posterior al embrionului (Fig.11C).

Stadiul 8: Extensia benzii germinale (3 ore și 45 minute - 4 ore și 30 minute)

Straturile celulare invaginate la nivelul cutei ventrale se aplatizează de-a lungul ectodermului și formează o bandă pluristratificată, numită banda germinală, care se curbează în jurul capătului posterior al embrionului și se alungește de-a lungul părții dorsale, până la nivelul în care capătul posterior al invaginării intestinului mediu atinge regiunea capului. Celulele dintre deschiderea invaginării posterioare a intestinului mediu și cuta cefalică se subțiază, astfel încât cutele dorsale și cefalice dispar gradat. Pe partea ventrală, banda germinală se curbează în interiorul

embrionului, la nivelul cutei cefalice, formând un spațiu tranzitoriu, între ea și anelopa vitelină (Fig.11D).

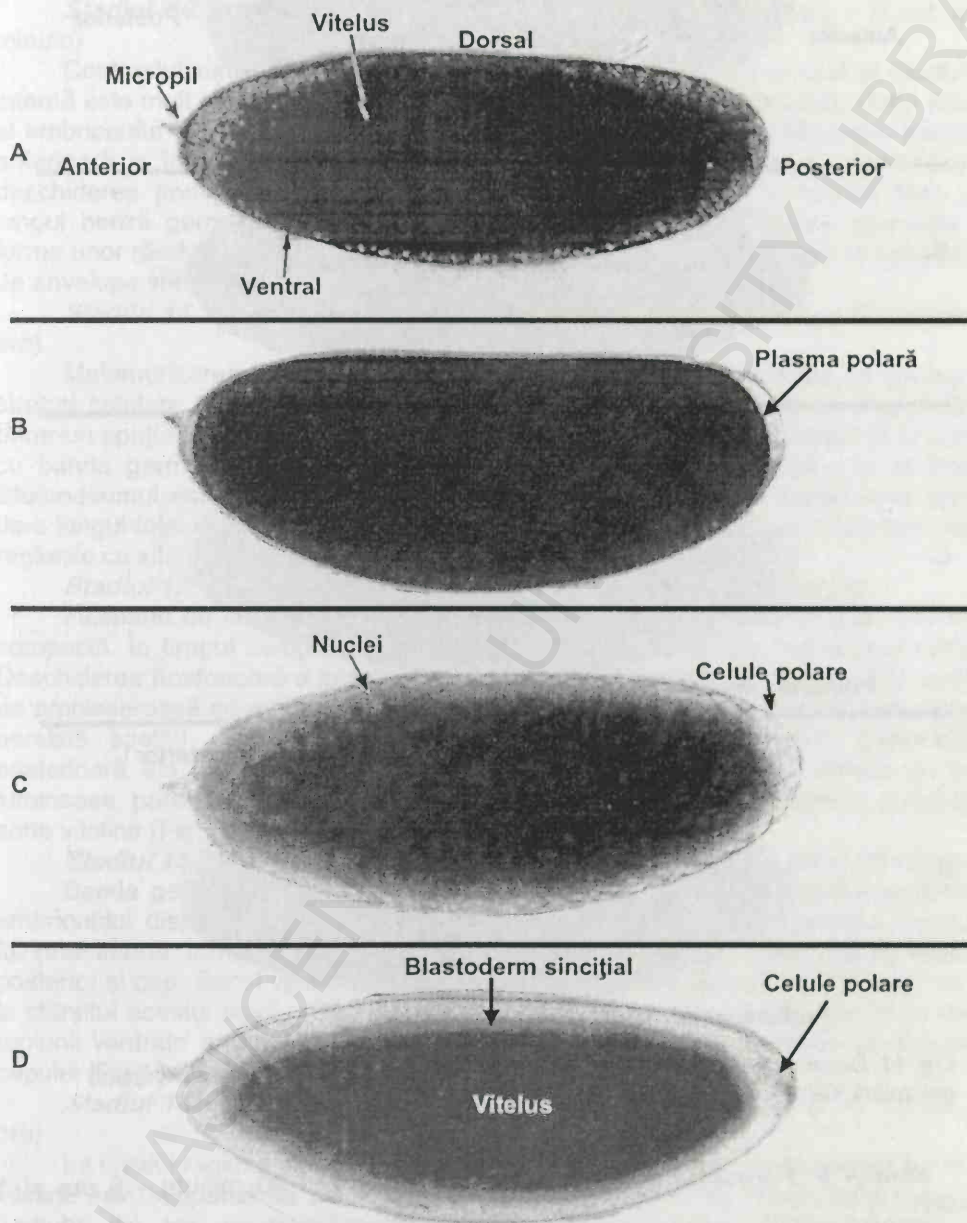


Fig.10. Dezvoltarea embrionară la *Drosophila*. A-Zigot. B-Segmentare timpurie. C-Formarea celulelor polare. D-Blastoderm sincițial.

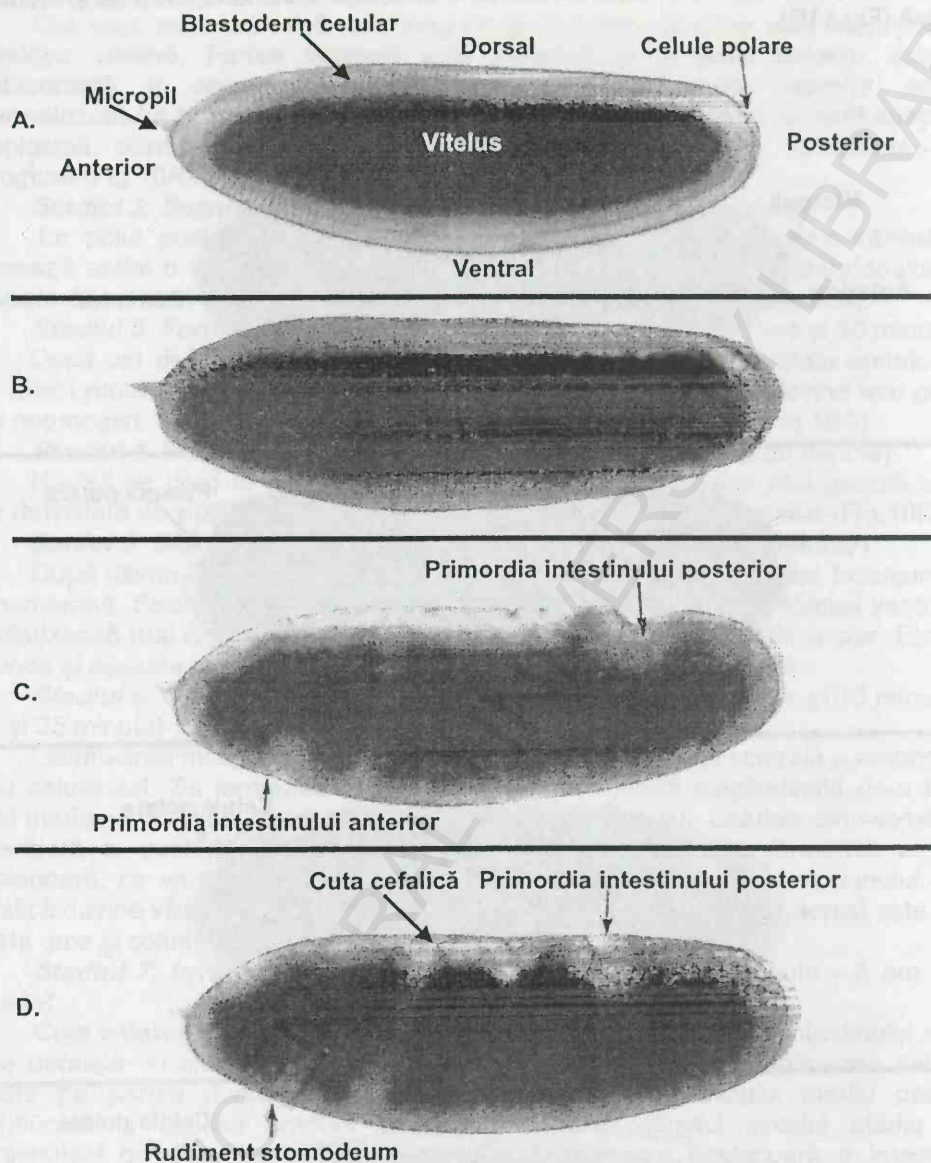


Fig. 11. Dezvoltarea embrionară la *Drosophila*. A-Blastoderm celular. B-Începutul gastrulării. C-Invaginarea intestinului mediu. D-Extensia benzii germinale.

Stadiul 9. Formarea plăcii stomodeale (4 ore și 30 minute - 5 ore și 10 minute)

Deschiderea intestinului a ajuns la nivelul regiunii capului și cuta cefalică nu mai este vizibilă. Regiunea dorsală a capului este foarte subțire și nu se distinge de vitelus. Amnioseroasa alcătuită din celule extraembrionare este complet formată. Banda germinală apare continuă. Unghiul anterior al intestinului mediu, curbura ventrală și deschiderea anterioară a intestinului mediu nu mai sunt vizibile. Intestinul

mediu anterior apare ca o excrescență în partea ventrală anterioară a benzii germinale. Viitoarea invaginare stomodeală este identificată ca o lacună puțin adâncă la nivelul invaginării anterioare a intestinului mediu. Banda germinală apare compactă și luminoasă și contrastează cu vitelusul intern, întunecat. Sacul vitelin prezintă o formă caracteristică de cârlig (Fig.12A).

Stadiul 10: Invaginarea stomodeumului (5 ore și 10 minute - 6 ore și 50 minute)

Contrastul dintre straturile celulare și vitelus este pierdut gradat și morfologia internă este mult mai dificil de urmărit. Când se formează stomodeumul, vârful anterior al embrionului se îndoaie ventral și apare o invaginare care se adâncește. Primordia anterioară a intestinului mediu se deplasează posterior, atingând și trecând de deschiderea posterioară a intestinului mediu, aplatizându-se în același timp de-a lungul benzii germinale ventrale. Segmentarea ectodermului devine aparentă sub forma unor rânduri spațiate regulat, formate odată ce banda germinală se retrage față de anelopa vitelină (Fig.12B).

Stadiul 11: Bandă germinală formată din trei straturi (6 ore și 50 minute - 9 ore)

Metamerizarea embrionului este evidentă. În banda germinală se disting trei straturi celulare. La capătul posterior, embrionul este separat de anelopa vitelină printr-un spațiu. Regiunea anterioară a intestinului mediu este aplatizată și în contact cu banda germinală, mascând pe partea ventrală distincția dintre cap și trunchi. Stomodeumul este adânc. Prelungirea posterioară a intestinului mediu este așezată de-a lungul feței dorsale a benzii germinale și datorită proliferării neuroblastelor dispar regiunile cu vitelus dens, de la nivelul capului (Fig.12C).

Stadiul 12: Scurtarea benzii germinale (9 ore și 10 minute - 10 ore și 30 minute)

Începând de la capătul anterior, banda germinală se contractă și devine foarte compactă. În timpul compactării se pierde distincția dintre cele trei straturi celulare. Deschiderea posterioară a intestinului se deplasează posterior și sacul vitelin acoperit de amnioseroasă se extinde pe suprafața dorsală a embrionului. La capătul posterior persistă spațiul dintre embrion și anelopa vitelină. Primordiile anterioară și posterioară ale intestinului mediu formează prelungiri digitiforme, vizibile ca benzi luminoase, paralele cu banda germinală. Regiunea capului este distinctă și lipsită de zone viteline (Fig.12D).

Stadiul 13: Scurtarea embrionului (10 ore și 30 minute - 11 ore și 30 minute)

Banda germinală este contractată complet și spațiul de la capătul posterior al embrionului dispare. Primordiile anterioară și posterioară ale intestinului mediu au fuzionat lateral, formând o bandă continuă, situată la un unghi drept față de intestinul posterior și cap. Sacul vitelin este inițial concav pe partea dorsală, dar devine convex la sfârșitul acestui stadiu. Capul se îndoaie dorsal și se lărgeste spațiul de la nivelul regiunii ventrale anterioare. Se formează o cută dorsală la marginea posterioară a capului (Fig.13A).

Stadiul 14: Involuția capului și închiderea dorsală (11 ore și 30 minute - 13 ore)

La nivelul regiunii mediene dorsale a embrionului, protuberanța convexă a masei viteline este acoperită de amnioseroasă. Banda germinală se alungește anterior și o porțiune din cap se invaginează în interiorul embrionului. Clypeo-labrumul este distinct. Începe formarea sacului frontal, odată ce cuta dorsală se deplasează anterior, acoperind regiunea capului. Intestinul posterior se dezvoltă antero-dorsal și formează un unghi mai ascuțit cu intestinul mediu. Plăcile anale și spiraculii posteriori devin structuri distincte. Închiderea dorsală continuă (Fig.13B).

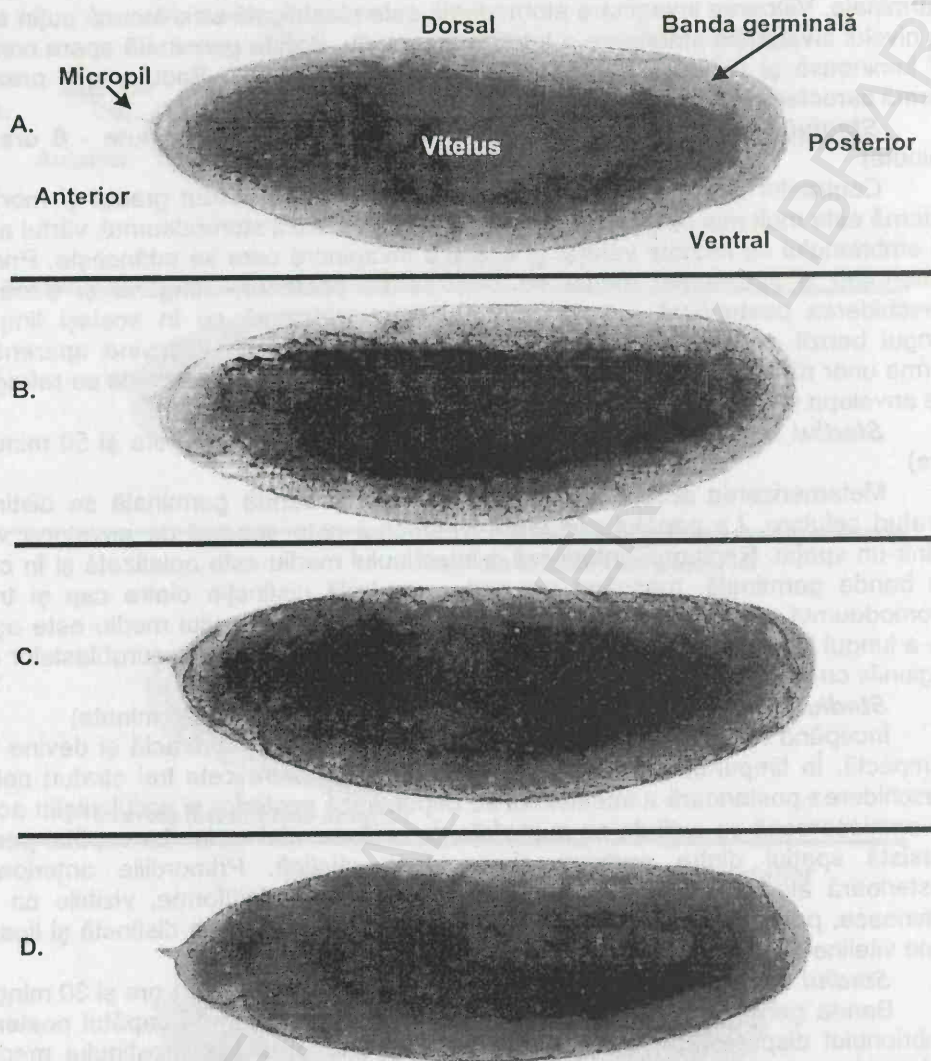


Fig.12. Dezvoltarea embrionară la *Drosophila*. **A-**Formarea plăcii stomodeale. **B-**Invaginarea stomodeumului. **C-**Bandă germinală formată din trei straturi. **D-**Scurtarea benzii germinale.

Stadiul 15: Închiderea dorsală terminată (13 ore - 15 ore)

Invaginarea capului și închiderea dorsală a ectodermului este completă. În timpul acestui stadiu are loc închiderea dorsală a musculaturii și intestinului. Inițial intestinul mediu are formă de "inimă". Ulterior, constricțiile împart intestinul mediu în trei regiuni spațiate regulat (Fig.13C).

Stadiul 16: Condensarea sistemului nervos central (15 ore - până la terminarea dezvoltării embrionare)

Mișcările morfogenetice majore ale acestui stadiu sunt reprezentate de condensarea sistemului nervos și conversia intestinului saciform într-o structură tubulară, sinuoasă, lungă. Odată ce sistemul nervos se contractă de-a lungul regiunii

ventrale a embrionului, ansele intestinale umplu spațiul dintre capătul posterior al sistemului nervos ventral și structurile anale. În intestin încep mișcările musculare și la scurt timp devin aparente și în musculatura somatică (Fig.13D).

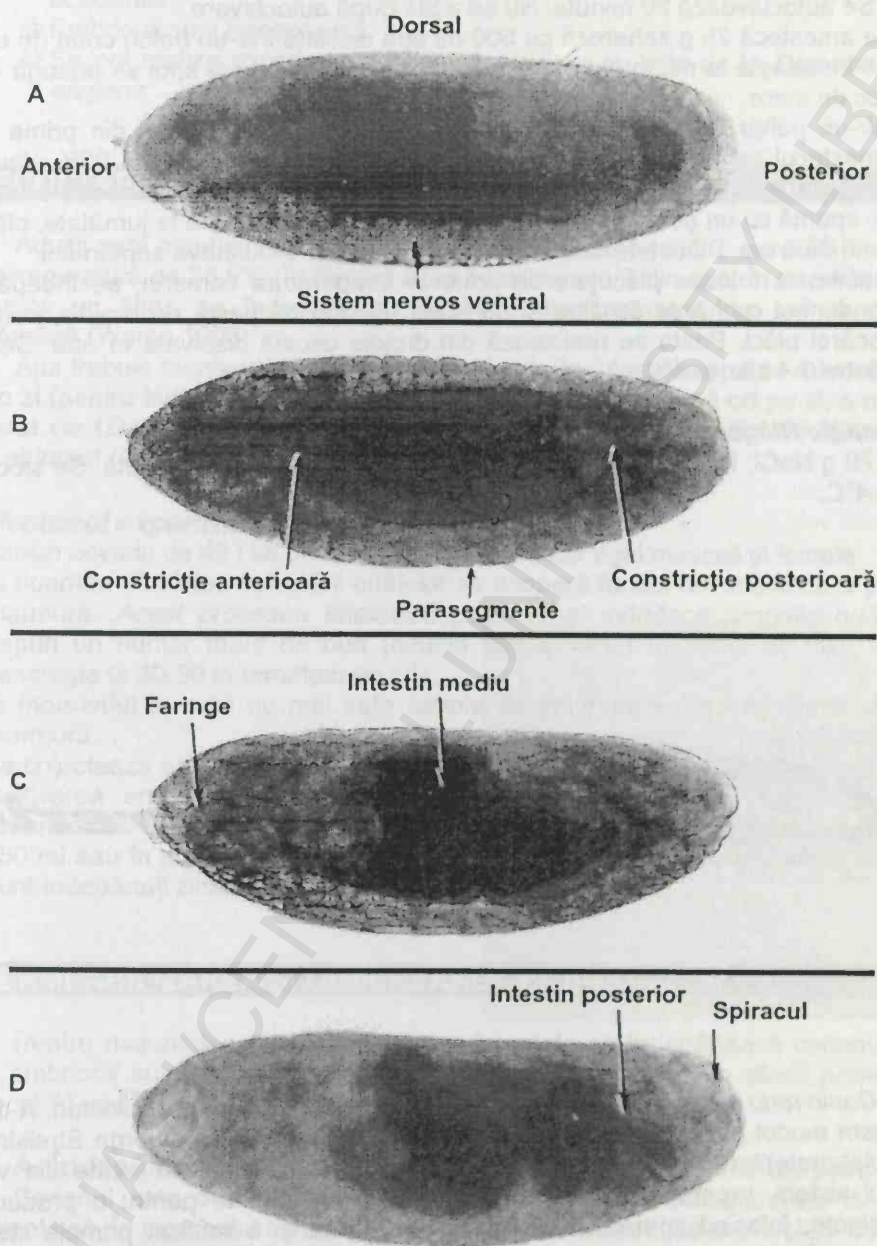


Fig. 13. Dezvoltarea embrionară la *Drosophila*. A-Scurtarea embrionului. B-Involuția capului. C-Închiderea dorsală terminată. D-Condensarea sistemului nervos central.

III. MEDII ȘI SOLUȚII

■ *Mediu nutritiv solid*

Se adaugă 2 X 17,5 g agar la 2 X 500 ml apă distilată, în baloane cotate de 2 X 1 l. Se autoclavează 20 minute. Nu se agită după autoclavare.

Se amestecă 25 g zaharoză cu 500 ml apă distilată într-un balon cotat de un litru.

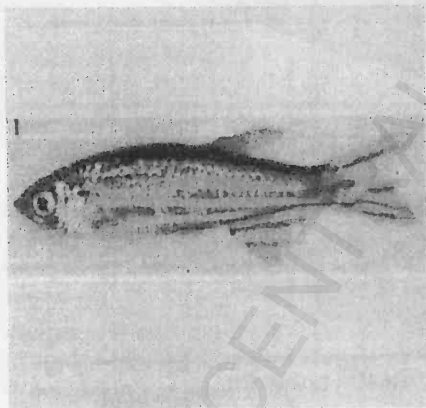
Se încălzește la microunde la putere maximă, 4 minute și apoi se adaugă 500 ml suc de mere.

Într-un pahar Berzelius de 4 l se amestecă în ordine: agarul din prima etapă, amestecul zaharoză-suc de mere, 4 g Nipagin dizolvat în 20 ml 95% etanol. Se agită pe agitator magnetic evitând formarea bulelor; se îndepărtează orice urmă de spumă cu un șervețel. Se umple cu acest amestec, până la jumătate, plăcuțele Petri de 5 cm. Plăcuțele cu mediu se pot păstra la 4°C câteva săptămâni.

Înainte de folosire plăcuțele se aduc la temperatura camerei, se îndepărtează condensul cu hârtie de filtru și se pune un bob de pastă de drojdie în mijlocul fiecărei plăci. Pasta se realizează din drojdie uscată dizolvată în apă. Se poate păstra 3-4 zile, la 4°C.

■ *Soluție Ringer*

3,79 g NaCl; 0,165 g KCl; 0,15 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 500 ml apă distilată. Se stochează la 4°C.



Danio rerio

Danio rerio este un ciprinid de apă dulce, originar din India și Pakistan. A devenit organism model pentru biologia modernă odată cu lucrările lui George Streisinger și ale colaboratorilor de la Oregon University, care au recunoscut multe din virtuțile acestui sistem experimental. Streisinger a elaborat metode pentru a produce linii homozigote, folosind spermatozoizi inactivați genetic și a realizat primele studii de mutageneză.

Avantajele sale ca organism model sunt următoarele:

- ☺ Generații scurte (3 luni), durata de viață fiind de 2-3 ani. Adulții au 4-5 cm lungime și cântăresc 2-3 g;

- ☺ Se poate obține un număr mare de ouă tot timpul anului. Femelele pot depune 50-100 de ouă în fiecare săptămână, dar în laborator se pot obține 1000 sau mai mulți embrioni de la o singură femelă;
- ☺ Datorită faptului că fecundarea este externă toate stadiile de dezvoltare sunt accesibile;
- ☺ Embrionii sunt transparenți;
- ☺ Se pot realiza experimente genetice similare cu cele de la *Drosophila* și *C. elegans*;

I. RECOLTAREA ȘI CULTIVAREA EMBRIONILOR

Adulții sunt menținuți în acvarii de 40 l, câte 24 de pești (12 perechi) în fiecare, la o temperatură de 28,5°C. În fiecare zi se înlocuiește 1/3 din apă. În cazul în care se folosește un filtru, se îndepărtează jumătate din cantitatea de apă o dată pe săptămână (Warga, 1993).

Apa trebuie menținută, curată, fără reziduuri. Se folosește apa de robinet, care a stat o zi (pentru îndepărtarea clorului). Peștii sunt hrăniți de două ori pe zi, o masă de preferat vie (*Daphnia*, adulți sau larve de *Drosophila*). Controlul ciclului zi/noapte se face automat (14 ore lumină, 10 ore întuneric).

Protocol experimental

1. Într-un acvariu de 40 l se pun 24 de pești, în număr egal masculi și femele.
2. În noaptea dinaintea colectării ouălelor se acoperă fundul acvariului cu o placă de marmură. Acest procedeu împiedică peștii să-și mănânce propriile ouă. Peștii depun un număr mare de ouă (câteva sute/acvariu) în prima zi, însă numărul descrește la 30-50 în următoarele zile.
3. În momentul în care nu mai este nevoie de embrioni se îndepărtează placa de marmură.
4. Se colectează embrionii și se spală de câteva ori cu mediu embrionar proaspăt.
5. Cultivarea embrionilor în mediu embrionar la 28,5°C, până în stadiul dorit. Embrionii se cultivă la o densitate sub 50 de embrioni/100 ml, într-un recipient de 250 ml sau în plăci Petri de 90 mm, cu 10 ml mediu de cultură. Embrionii alterați sunt îndepărtați zilnic.

II. PERMEABILIZAREA ȘI OBSERVAREA EMBRIONILOR

Pentru majoritatea manipulărilor experimentale se îndepărtează corionul, după care embrionii sunt montați fie în 3% metilceluloză (embrioni în stadii presomitice, protocol A) sau în 1,2% agar (embrioni avansați, protocol B).

A. Îndepărtarea corionului și manipularea embrionilor timpurii

Corionul este o matrice extracelulară periovocitară, transparentă, de natură glicoproteică. În momentul ovipoziției, corionul se hidratează, se umflă și se desprinde de membrana plasmatică (Fig. 14).

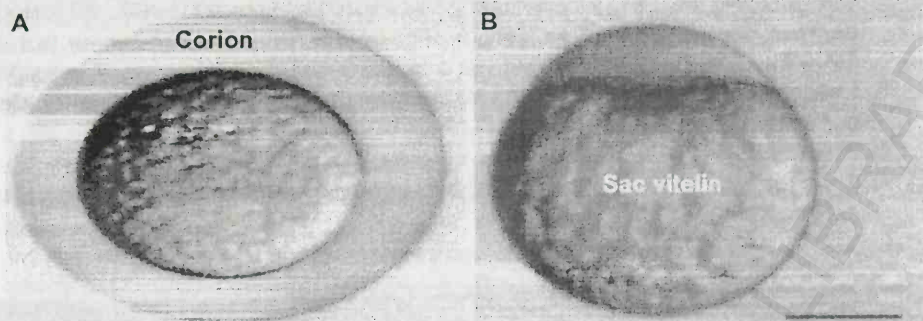


Fig. 14. A-Aspectul zigotului, înconjurat de corion la câteva minute după fecundare. B-Zigot fără corion, la 10 minute după fecundare. Bara=250 μ m.

Protocol experimental

1. Se recoltează embrionii în stadiul dorit, se spală cu mediu embrionar și se așează în plăcuțe acoperite cu 2% agar, ce conțin mediu embrionar.
2. Se îndepărtează corionul manual, sub stereomicroscop, folosind pense fine (Dumont No. 5). Se realizează un orificiu în corion și se agită cu grijă embrionul. *Embrionul nu trebuie să atingă suprafața mediului.*
3. Odată ce embrionul este eliberat din corion, se spală de câteva ori prin pipetare cu mediu embrionar și se transferă într-o placă cu agar. *Mediu embrionar conține Ca^{2+} , necesar pentru a păstra celulele din discoblastulă intacte, în timp ce agarul furnizează o suprafață neadezivă, netedă pentru embrioni.*
4. Se montează stadiile presomitice într-o lamă cu godeu, ce conține 3% metilceluloză. Embrionul este transferat ușor în picătura de metilceluloză, pentru orientarea sa fiind folosită o buclă din fir de nailon. Se acoperă picătura de metilceluloză cu câteva picături de mediu embrionar pentru a împiedica deshidratarea.
5. Pentru eliberarea embrionului din metilceluloză se imersează întreaga lamă în mediu embrionar. Se lasă 15-30 minute, ca metilceluloza să absoarbă mediu și să se înmoaie. Se scot embrionii cu o buclă fină de nailon.

B. Manipularea embrionilor avansați

Embrionii mai avansați de 18 somite se anesteziază înainte de montare, cu 10 picături de Tricaine în 5 ml mediu embrionar.

Protocol experimental

1. Se spală embrionii cu mediu embrionar și se îndepărtează corionul manual.
2. Se transferă embrionii într-un volum minim de mediu embrionar și se plasează pe o lamă de sticlă.
3. Se pipetează peste embrioni câteva picături de 1,2% agar lichid răcit la 37-40°C, după care se lasă să se întărească.
4. Se individualizează embrionii prin tăierea agarului în blocuri, fiecare conținând un embrion.
5. Se ia cu pensa blocul de agar și se orientează pe o lamă de sticlă. Dacă este necesar se acoperă cu mai mult agar lichid, pentru a-l menține în poziția corespunzătoare.

6. Experimentul se realizează printr-o fereastră tăiată în agar, deasupra regiunii de interes.
7. Îndepărtarea embrionilor din agar, se realizează prin imersarea lamei cu blocul de agar într-un vas cu mediu embrionar și introducerea unei pense închise la nivelul cozii embrionului. Prin deschiderea ușoară a pensei, agarul se crapă de-a lungul axei lungi a embrionului.

III. OBSERVAREA STADIILOR EMBRIONARE

Pe baza observațiilor realizate pe embrioni vii, de la care s-a îndepărtat corionul, Westerfield a descris în 1994, 20 de stadii embrionare la *Danio rerio*. Acestea au fost observate la microscopul de interferență Nomarski și sunt valabile pentru embrionii care se dezvoltă la o temperatură de 28,5°C. Diametrul embrionilor din stadiile 1-16 este de ~700 μm.

Stadiu 1: Zigot (0-30 minute)

Citoplasma fără vitelus se dispune la polul animal, unde se va forma discoblastula. Restul oului formează sacul vitelin (Fig.15A).

Stadiul 2: Două blastomere (45 minute) - (Fig.15B)

Stadiul 3: Opt blastomere (1 oră și 15 minute)

Două rânduri a câte patru blastomere (Fig.15C).

Stadiul 4: 32 celule (1 oră și 45 minute)

Două rânduri regulate de blastomere (Fig.15D).

Stadiul 5: 64 celule (2 ore)

Trei rânduri regulate de blastomere (Fig.15E).

Stadiul 6: 256 celule (2 ore și 30 minute)

Șapte rânduri de blastomere (Fig.15F).

Stadiul 7: 1000 celule (3 ore)

11 rânduri de blastomere și un singur rând de nuclei în sincițiul vitelin (Fig.16G).

Stadiul 8: Arcuirea discoblastulei (4 ore)

Axa pol animal-pol vegetativ a discoblastulei se aplatizează (Fig.16H).

Stadiul 9: Discoblastulă sub formă de cupolă (4 ore și 30 minute)

În centrul embrionului sincițiul vitelin se umflă către polul animal (Fig.16I).

Stadiul 10: Epibolie 40% (4 ore și 40 minute)

Marginile discoblastulei sunt la 30% din distanța dintre polul animal și cel vegetativ. Procentul indică proporția din sacul vitelin acoperit de discoblastulă (Fig.16J).

Stadiul 11: Epibolie 50% (6 ore)

Discoblastula are o grosime uniformă. Începe gastrularea și scutul embrionar este vizibil din polul animal. Formarea hipoblastului (Fig.16K-L).

Stadiul 12: Epibolie 75% (8 ore)

Partea dorsală este mai groasă. Epiblastul și hipoblastul se pot distinge clar (Fig.17M).

Stadiul 13: Epibolie completă (9 ore și 50 minute)

Îngroșarea primordiei creierului. Rudimentul notocordului este distinct față de placa segmentată. Este prezent mugurele cozii (Fig.17N).

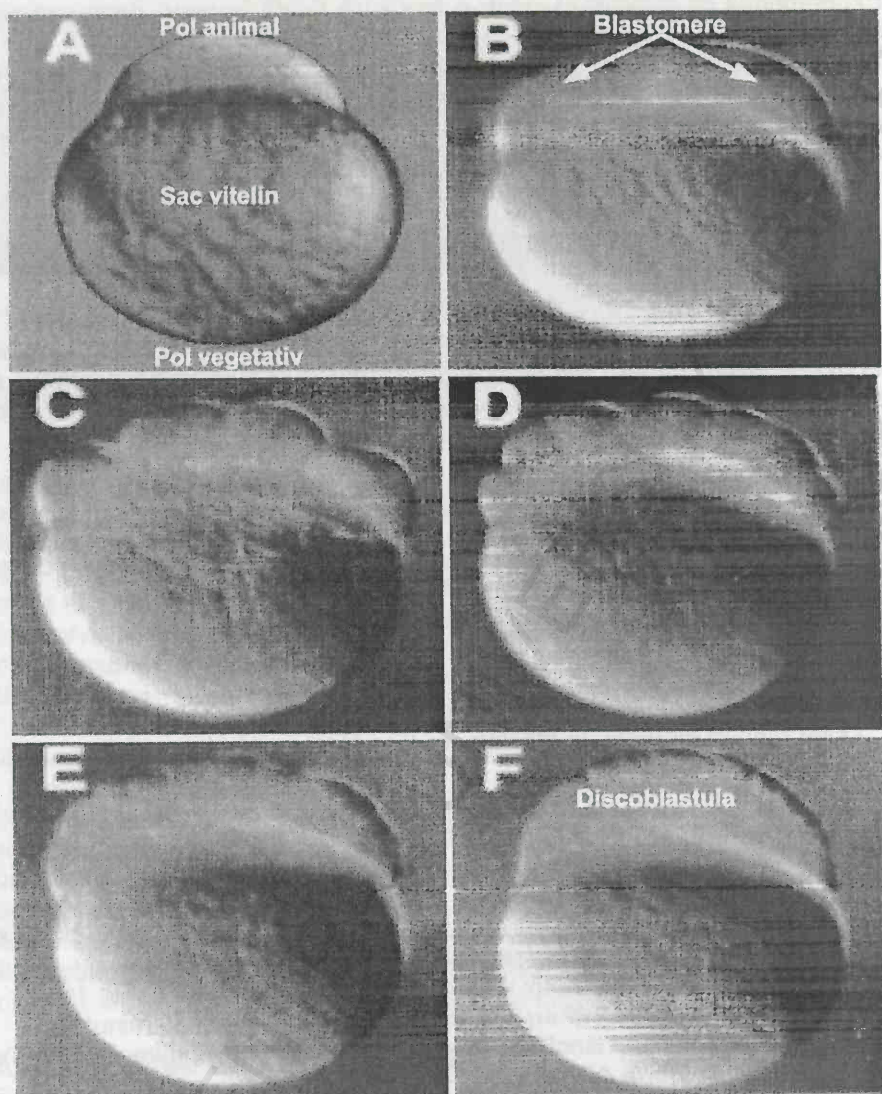


Fig. 15. Dezvoltarea embrionară la *Danio rerio*. A-Zigot. B-Două blastomere. C-Opt blastomere. D-32 de celule. E-64 de celule. F-256 de celule.

Stadiul 14: Începutul metamerizării (10 ore și 20 minute)
1 somită (Fig.17O).

Stadiul 15: 5 somite (11 ore și 40 de minute)

Sunt vizibile veziculele optice și vezicula Kupffer (Fig.17P). Vezicula descoperită de Kupffer este prezentă tranzitoriu, doar la teleosteenii și studiile recente indică că din ea se vor forma derivatele mezodermale ale cozii, inclusiv notocordul și mușchii (Kimmel și al.,1995).

Stadiul 16: 14 somite (16 ore)

Somitele sunt dispuse sub forma literei V. Sunt prezente placodele otice. Creierul este segmentat în neuromere (Fig.17Q).

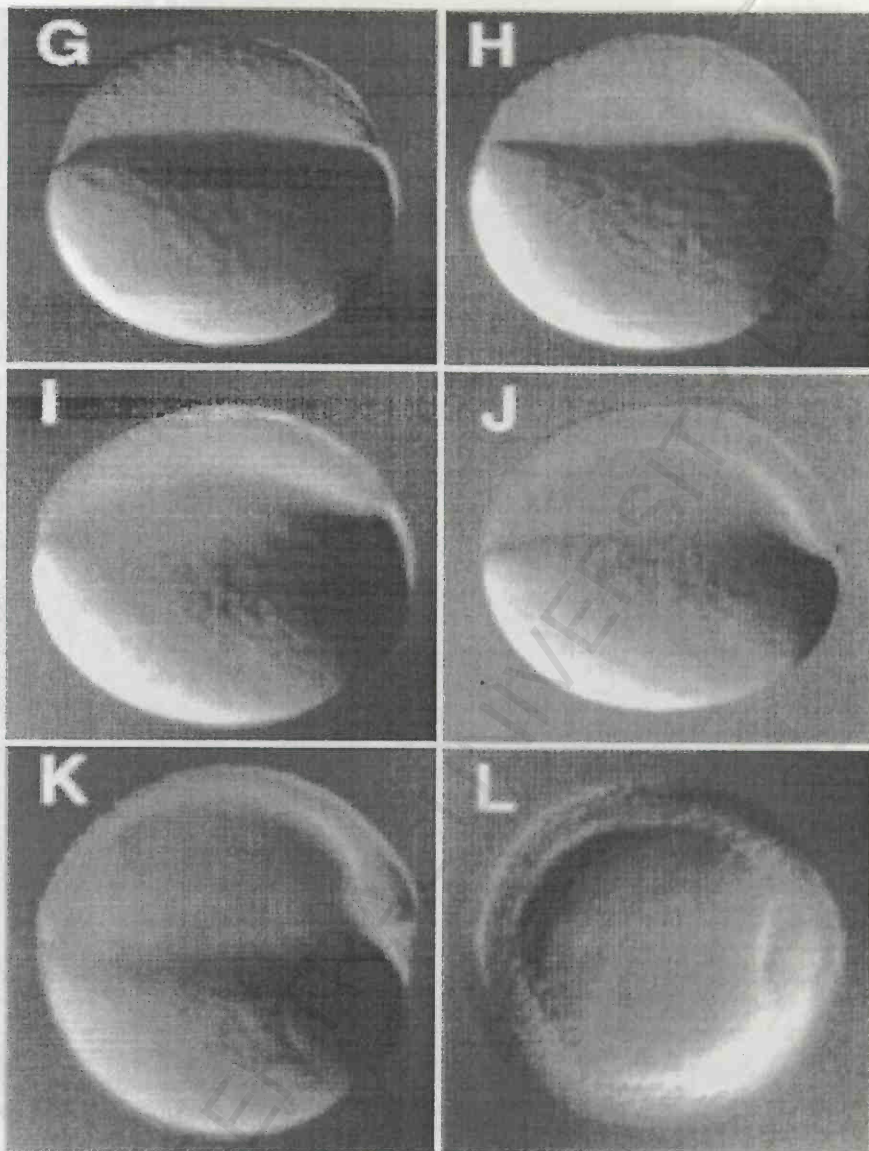


Fig.16. Dezvoltarea embrionară la *Danio rerio*. **G**-1000 de celule. **H**-Arcuirea discoblastulei. **I**-Discoblastulă sub formă de cupolă. **J**-Epibolie 40%. **K-L**-Epibolie 50%.

Stadiul 17: 20 somite (19 ore)

Rombomerele sunt proeminente. Apar veziculele otice și cristaliniene. Mușchii se contractă. Are loc îndoirea capului la nivelul rhombencefalului. (Fig.17R)

Stadiul 18: 26 somite (22 ore)

2 otoliți în capsulele otice (Fig.18S)

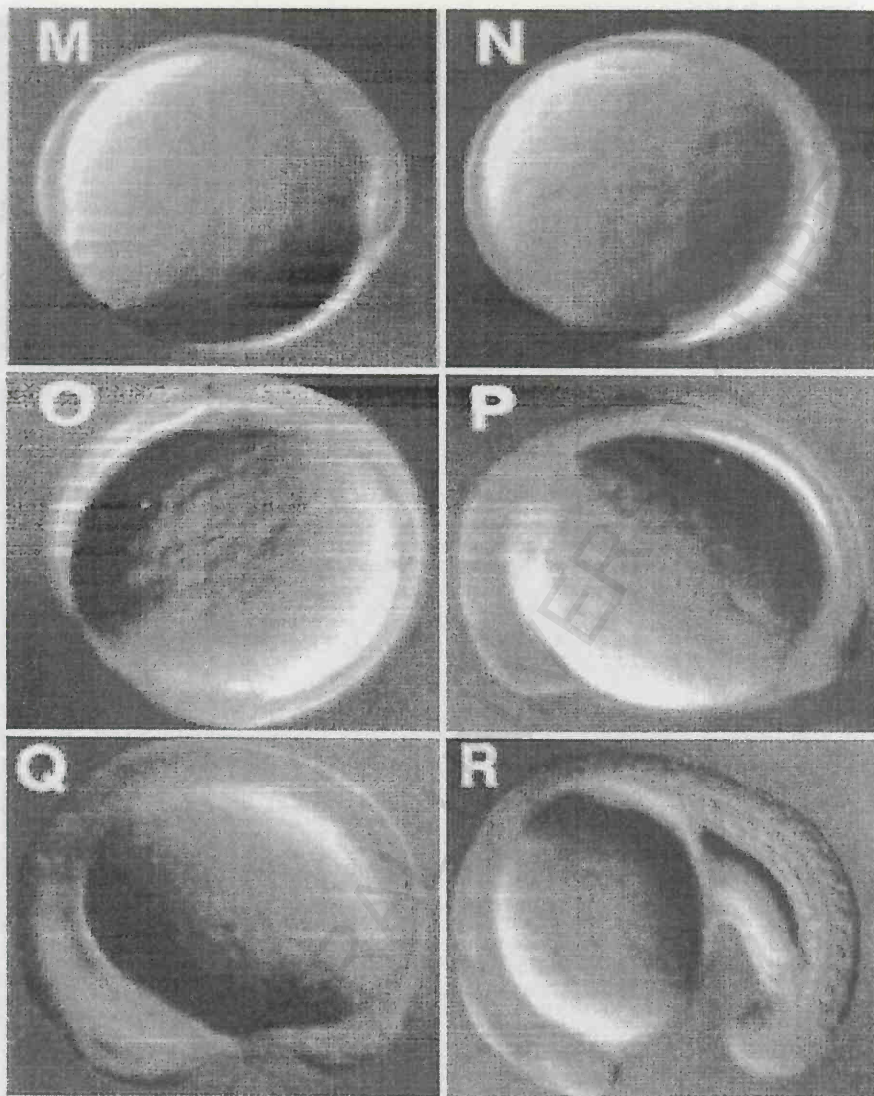


Fig.17. Dezvoltarea embrionară la *Danio rerio*. M-Epibolie 75%. N-Epibolie completă. O-Începutul metamerizării. P-5 somite. Q-14 somite. R-20 somite.

Stadiul 19. Alevin liniar (48 ore)

Unghiul cap-trunchi este de 45° . Apar mugurii înotătoarelor pectorale. Sunt prezenți ~6 melanofori pe partea laterală și iridofori în retină. Lungimea alevinului este de 3 mm. (Fig.18T)

Stadiul 20. Alevin care se hrănește (5 zile)

Lungimea alevinului este de 3,5 mm (Fig.18U).

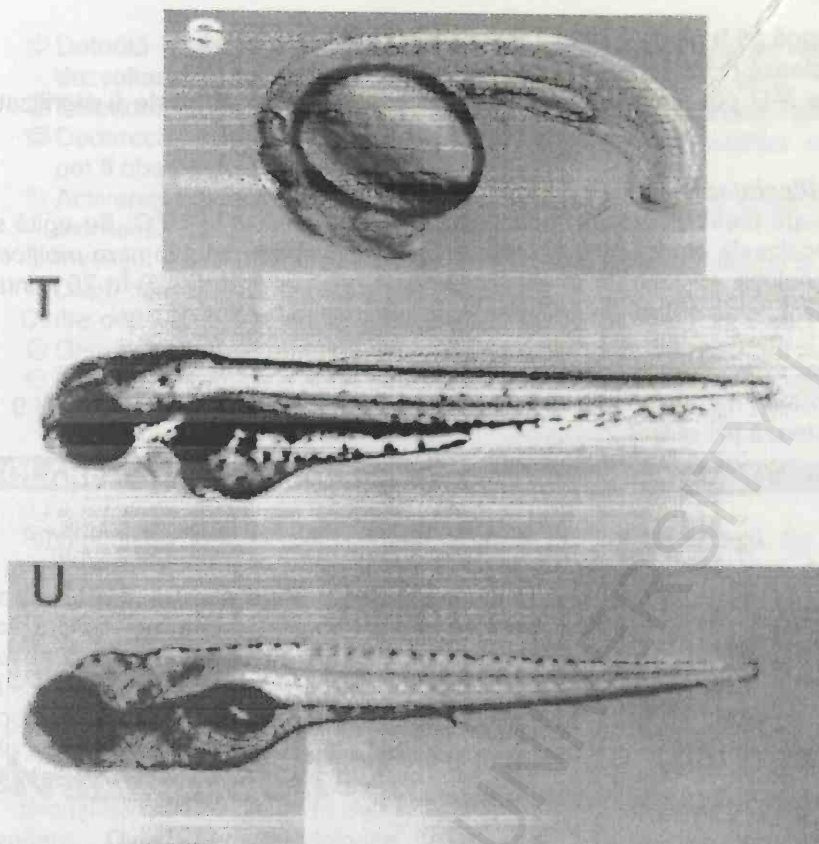


Fig.18. Dezvoltarea embrionară la *Danio rerio*. S-26 somite. T-Alevin. U-Alevin care se hrănește.

IV. MEDII ȘI SOLUȚII

■ 1,2% agar pentru montarea embrionilor

Se fierbe 1,2 g agar în 100 ml mediu embrionar; se răcește la 37-40°C și se alicotează în tuburi într-o baie de apă la aceeași temperatură.

■ 2% agar pentru tapetarea plăcilor Petri

Se dizolvă prin fierbere 2 g agar bacteriologic în mediu embrionar, se răcește până la ~45°C și se pipetează rapid în plăcuțe.

■ Mediu embrionar

Soluții stoc:

A: 8 g NaCl; 0,4 g KCl; 100 ml H₂O

B: 0,358 g Na₂HPO₄; 0,6 KH₂PO₄; 100 ml H₂O

C: 1,22 g CaCl₂; 100 ml H₂O

D: 2,46 g MgSO₄·(7H₂O); 100 ml H₂O

E: 0,35 g NaHCO₃; 10 ml H₂O

Se amestecă 1 ml soluție A, 0,1 ml soluție B, 1 ml soluție C.

Se adaugă 95,9 ml H₂O, apoi 1 ml soluție D și 1 ml soluție E

Se ajustează pH-ul la 7-7,5.

Soluțiile A-D pot fi autoclavate pentru stocare; Soluția E poate fi sterilizată prin filtrare.

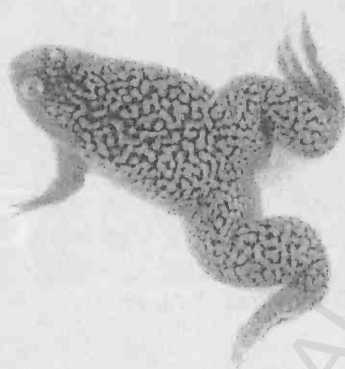
■ 3% metilceluloză

Se adaugă metilceluloza în mediu embrionar preîncălzit la 60°C. Se agită soluția și se încălzește pentru încă 10 minute la 60°C. În momentul în care metilceluloza este în soluție, se răcește la -20°C, pentru 1 oră, agitând din 20 în 20 minute. Se stochează peste noapte la 4°C, pentru îndepărtarea bulelor de aer.

■ Tricaine

0,4 g tricaine metansulfonat (MS222, Sigma); 98,2 ml H₂O; 1,8 ml Tris pH 9

Se ajustează pH-ul la 7,2.



Xenopus laevis

Xenopus laevis a reprezentat un model experimental încă din 1950. Până la mijlocul anilor 1950 acest amfibian a fost folosit în testul de sarcină, deoarece injectarea de urină de la o femeie însărcinată (conține gonadotropină corionică) în sacul limfatic dorsal al unei femele de *Xenopus* determină eliberarea pondei

Amfibienii reprezintă arhetipul dezvoltării vertebratelor. Dezvoltarea de la reptile, păsări și mamifere poate fi dedusă ușor din modelul amfibian, reprezentat de broaște și tritoni. În trecut, majoritatea studiilor embrionare la amfibieni s-au realizat pe triton, însă ulterior a fost preferată *Xenopus laevis*.

Xenopus a devenit un model popular pentru studiile embrionare din următoarele motive:

- ☺ Se reproduce ușor în laborator;
- ☺ Ovulația poate fi indusă în orice moment prin injectarea de gonadotropină;
- ☺ Dezvoltarea embrionară este externă și embrionii sunt accesibili pentru manipulare pe tot parcursul dezvoltării;
- ☺ Oul este mare (~1,4 mm) fiind relativ ușor de manipulat și microdisecat;
- ☺ Celulele embrionare individuale pot fi transplantate, cultivate și îndepărtate manual;

- ☺ Datorită vitelusului, fragmentele embrionare sunt capabile să-și continue dezvoltarea în soluții saline sterile, fără adăugarea de nutrienți;
 - ☺ Embrionii parcurg stadiile de la fecundare la mormoloc foarte rapid;
 - ☺ Deoarece morfogeneza are loc rapid, efectele manipulărilor experimentale pot fi observate în câteva zile;
 - ☺ Activarea zigotică a genomului are loc doar la 6-7 ore după fecundare, în momentul tranziției la blastula mijlocie;
 - ☺ Învelișul gelatinos transparent poate fi îndepărtat ușor chirurgical sau chimic;
 - ☺ După operațiile chirurgicale amfibienii sunt foarte rezistenți la infecții;
- Dintre dezavantajele acestui organism model amintim:
- ⊗ Genom pseudotetraploid;
 - ⊗ În condiții normale o nouă generație se poate obține după 1-2 ani;

I. IZOLAREA ȘI CULTIVAREA OVOCITELOR

Amfibienii se țin în acvarii mari, cu o broască la 2-4 litri de apă. Se păstrează în apă curată, schimbată la 1-2 ore după hrănire. Se recomandă folosirea de sisteme de reciclare și purificare a apei. Trebuie avut în vedere că *Xenopus* va mânca tot ce mișcă, inclusiv proprii mormoloci. Este de preferat ca femelele și masculii să fie plasați în acvarii separate. Femelele pot fi menținute câțiva ani și reciclate la 4-6 luni. Masculii sunt sacrificați pentru a obține omogenate testiculare. Starea de sănătate se verifică periodic. Dintre simptomele care pot indica alterarea stării de sănătate amintim: înot foarte încet, tegument rugos, pete roșii pe burtă sau picioare. Broaștele bolnave sunt îndepărtate.

Broaștele mature conțin în ovare un număr mare de ovocite, în toate stadiile de dezvoltare. Ovocitele sunt folosite pentru diferite experimente: (1) studii de endocitoză; (2) injectarea de acizi nucleici și proteine pentru traducere și/sau procesare; (3) distrugerea unor ARNm maternale prin injectarea de oligonucleotide antisens, în scopul testării funcției lor ulterioare în embriogeneză, după reintroducerea într-o "mamă adoptivă"; (4) datorită dimensiunii mari, ovocitele în stadiile V-VI sunt folosite ca sursă de material pentru experimentele biochimice (Ruiz i Altaba, 1993).

Pentru majoritatea studiilor, celulele foliculare periovocitare nu afectează experimentele și pot fi păstrate.

A. Obținerea unui număr mic de ovocite (defolicularea manuală)

Metoda se folosește în cazul injectării în ovocite a ARNm sau a altor molecule, precum și în studiul endocitozei ovocitare.

Protocol experimental

1. Se anesteziază femela prin plasarea într-un tanc, cu o cantitate mică de apă, ce conține 0,1% MS222. Odată anesteziată, broasca se așează pe spate, pe un prosop umed.
2. Se realizează în partea laterală a abdomenului o incizie mică, paralelă cu axa principală a corpului, după care se secționează tegumentul și musculatura.
3. Se prinde ovarul cu o pensă, se scoate afară din cavitatea abdominală și se secționează un fragment, care se plasează într-o placă Petri cu 1X soluție salină Barth modificată. Dimensiunea fragmentului depinde de câte ovocite sunt necesare în experiment (Fig.19).

4. Se introduce cu grijă ovarul rămas în cavitatea abdominală și se suturează mușchii și tegumentul. Broasca se plasează până își revine din anestezie într-un acvariu cu o cantitate mică de apă.

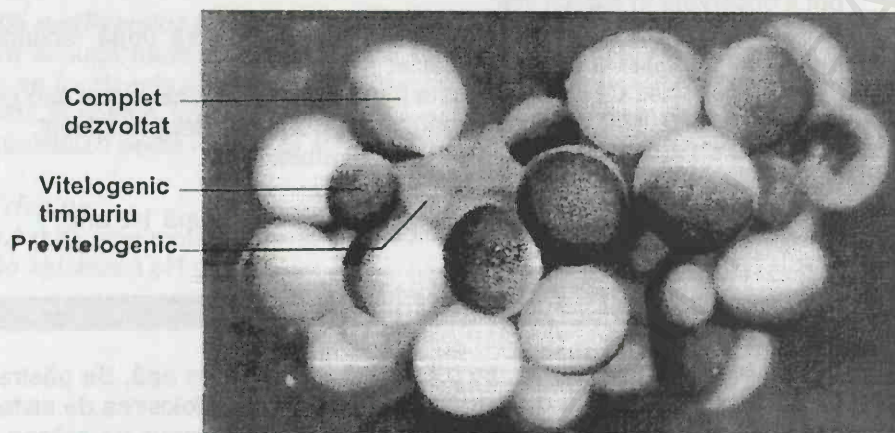


Fig.19. Fragment de ovar în care se remarcă trei categorii de ovocite.

5. Se prinde cu o pensă fină pediculul prin care foliculii sunt atașați de ovar iar cu a doua pensă se prinde țesutul folicular și se decojește ovocitul (operație similară decojirii unui bob de strugure). Defolicularea este reușită dacă pe suprafața ovocitului nu se observă vase de sânge. Ovocitele defoliculate sunt în general mai puțin turgescențe decât cele cu celule foliculare. Cu experiență se pot defolicula 100-200 de ovocite/oră.
6. Se sortează ovocitele în funcție de dimensiuni cu o pipetă. Au fost caracterizate 6 stadii ovocitare; (a) ovocite transparente, 50-100 μm ; (b) ovocite albe sau opace, 100-450 μm ; (c) ovocite pigmentate uniform, 450-600 μm ; (d) ovocite cu emisfera animală intens pigmentată, 600-1000 μm ; (e) ovocite complet dezvoltate, 1000-1200 μm ; (f) ovocite mature, >1200 μm (Fig.20).

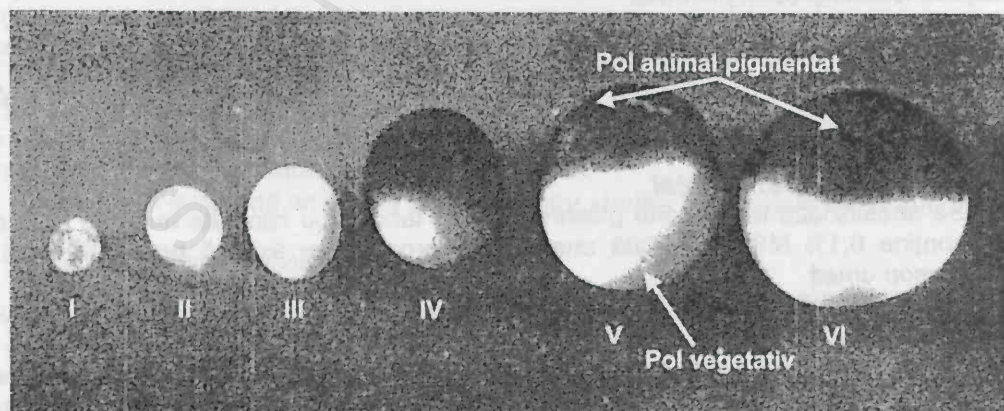


Fig. 20. Categoriile de ovocite obținute după defoliculare manuală. Bara=500 μm .

B. Obținerea unui număr mare de ovocite

Pentru experimentele care necesită câteva mii de ovocite, țesutul ovarian este tratat cu collagenază. Timpul necesar pentru digestia enzimatică este diferit în funcție de loturile de collagenază și țesutul ovarian de la diferite femele. În general, se observă continuu ovocitele la stereomicroscop și în momentul în care ovocitele individuale (sau grupurile de ovocite) se eliberează din țesutul folicular sunt scoase din soluția enzimatică și spălate intens cu soluție salină. Digestia enzimatică prelungită îndepărtează anvelopa vitelină și ovocitele devin foarte fragile. Se transferă ovocitele defoliate în soluție salină Barth modificată, proaspătă și se spală de câteva ori. Ovocitele izolate se pot păstra la 18°C până la o săptămână. Collagenaza poate inhiba maturarea ovocitară indusă de progesteron și determină o scădere semnificativă a sintezei proteice. Sunt necesare cel puțin 8 ore pentru revenirea ovocitelor după tratamentul enzimatic, comparativ cu ovocitele defoliate manual (Smith și al., 1991).

Tratamentul țesutului ovarian cu collagenază eliberează ovocite în toate stadiile de dezvoltare.

Protocol experimental

1. Primele trei etape sunt identice cu protocolul anterior, cu mențiunea că se recoltează un fragment mai mare de ovar, tot ovarul sau ovare de la mai multe femele.
2. Se mărunțește țesutul ovarian în fragmente mici și se incubează 2-4 ore, în 0,2% collagenază tip I, diluată în 0,1 M tampon fosfat, pH 7,4, într-un vas Petri, pe o platformă rotativă.
3. Sortarea ovocitelor în funcție de mărime se realizează prin trecerea lor prin site Nitex cu pori de diferite dimensiuni.

C. Cultivarea ovocitelor

În general, înaintea folosirii lor în experimente, ovocitele disecate din ovar sunt plasate peste noapte în soluție salină. Această incubare inițială permite o evaluare a viabilității celulelor dintr-un anumit ovar. Dacă o proporție mare de celule (>10%) mor peste noapte sau apar cu morfologie anormală, se folosește alt ovar, mai ales dacă experimentele necesită supraviețuirea pe termen lung. Pentru experimentele pe termen scurt se folosește soluția salină OR2⁸. Dacă este necesar ca ovocitele să supraviețuiască 2-3 zile în cultură, se transferă într-un mediu nutritiv, de tipul Leibovitz (L-15), suplimentat cu 5% ser fetal de vițel, dializat. Mediul se schimbă din trei în trei zile. Amfibienii fiind animale poichiloterme, cultura se realizează la temperatura camerei.

Protocol experimental

1. Izolarea ovocitelor prin metoda descrisă în secțiunea IA și plasarea în vase Petri cu soluție salină Barth modificată. Dacă nu există hotă cu flux laminar soluția este suplimentată cu antibiotice (50 μg/ml gentamicină sau penicilină și 250 μg/ml streptomycină).
2. Îndepărtarea manuală (secțiunea IA, protocol A) sau chimică (secțiunea IB, protocol B) a celulelor foliculare.

⁸Oocyte Ringer

3. Cultivarea ovocitelor în soluție salină OR2 sau mediu Leibovitz, suplimentat cu 5% ser fetal de vițel, în funcție de scopul urmărit.

II. ENUCLEAREA OVOCITELOR

Vezicula germinală (nucleul ovocitar) poate fi izolată manual din ovocite aflate la sfârșitul creșterii ovocitare.

Protocol experimental

1. Se izolează foliculi ovarieni în stadiul IV-V, prin metoda prezentată în secțiunea IA.
2. Se plasează foliculii ovarieni într-o placă Petri, cu soluție salină OR2. Operația se realizează la stereomicroscop.
3. Se înțepă polul animal pigmentat cu un ac spatulat și se presează ușor regiunea ecuatorială. În citoplasma albicioasă, plină cu vitelus se observă nucleul sub forma unei bile translucide de 50-100 μm diametru (Fig.21).
4. Pentru localizarea nucleară a produșilor traduși după injectarea ARN sau plasmide, se îndepărtează prin pipetare materialul care aderă de vezicula germinală, de tipul vitelusului sau reticulului endoplasmatic. Pentru a nu-l distruge se evită contactul nucleului cu suprafața lichidului.

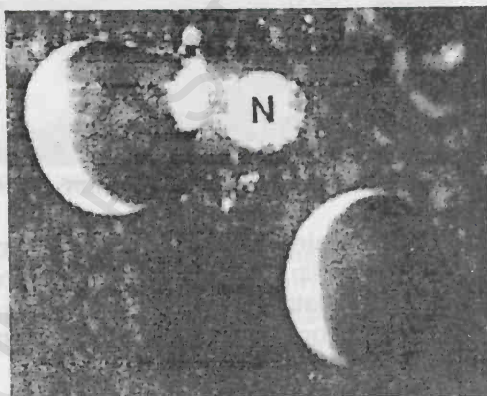


Fig. 21. Ovocit enucleat. N-nucleu.

III. OBTINEREA GAMETILOR PENTRU FECUNDAREA *in vitro*

În mod normal, ovulele sunt fecundate asincron, pe măsură ce sunt eliberate din cloacă și vin în contact cu spermatozoizii. Pentru majoritatea experimentelor efectuate în laborator, ovulația este indusă hormonal și fecundarea este realizată *in vitro*. Acest procedeu permite obținerea unei populații embrionare cu dezvoltare sincronă.

Protocol experimental

1. Se injectează femela cu ser de iapă gestantă (PMSG⁹) (~30 unități) subcutanat, în sacul limfatic dorsal, cu 1-7 zile înaintea zilei în care sunt necesare ovulele. Acest procedeu stimulează maturarea ovocitară.
2. Se injectează gonadotropină corionică umană (800-1500 unități) pentru a induce ovulația. La temperatura camerei, femelele încep să depună ouă după 6-8 ore sau după 10-15 ore dacă ele sunt plasate în apă, la 16°C. Dacă femela este injectată la ora 10-11 p.m va ovula în dimineața următoare.
3. Înaintea colectării ovulelor se sacrifică masculii, aneșteziați în prealabil. Se realizează o incizie perpendiculară pe axa principală a corpului, în regiunea

⁹ Pregnant mare serum gonadotropin

inferioară a abdomenului. Se îndepărtează ușor țesutul gras și se evidențiază cele două testicule albicioase, care se disecă și se plasează într-un vas Petri cu ~15 ml soluție salină Barth modificată, suplimentată cu antibiotice (50 $\mu\text{g/ml}$ penicilină și 250 $\mu\text{g/ml}$ streptomycină). Țesutul testicular poate fi menținut la 4°C, 4-5 zile.

4. Ovulele se colectează din acvariu cu o pipetă de 25 ml, dacă broaștele sunt ținute în 1X ELS sau se presează foarte ușor cu degetele abdomenul femelelor, dacă broaștele sunt păstrate în apă. În acest caz ovulele se recoltează în vase goale, fără lichid. *Ovulele lăsate în apă (dar nu în ELS) sunt activate și nu vor fi fecundate.*
5. Se mărunțește testiculul în fragmente mici și se omogenizează ușor.
6. Se plasează ovulele într-un vas Petri gol, peste care se pune omogenatul testicular și se amestecă. Se lasă în repaus 2-5 minute.
7. Se umple vasul cu 0,1X soluție Ringer modificată, pH 6,5. Ovulele vor adera de fundul vasului prin învelișul gelatinos.
8. Ovulele fecundate vor suferi rotația corticală, astfel încât în ~20 minute polul animal se plasează deasupra. Zigotul suferă prima diviziune de segmentare la temperatura camerei, după 90 minute. Spotul alb din polul animal, care indică vezicula germinală, în ovocitele mature și ovulele nefecundate va dispărea.
9. Pentru a încetini dezvoltarea, ovulele fecundate sau embrionii în stadiile dorite se plasează la temperatură scăzută (16°C). *Temperatura viabilă este între 15-24°C. Embrionii pot fi menținuți la 4°C o perioadă limitată.*

IV. MANIPULAREA ȘI OBSERVAREA EMBRIONILOR

Înainte de manipulare se îndepărtează învelișul gelatinos (Fig.22), prin incubarea 3-10 minute, cu 3% cisteină în 0,33X soluție Ringer modificată, pH 7,6. Întotdeauna se folosește cisteină proaspătă. Se schimbă soluția de cisteină, o dată sau de două ori, în funcție de cât de rapid se dizolvă învelișul gelatinos. Dacă embrionii sunt menținuți prea mult în cisteină devin albicioși și mor.

Se spală de câteva ori cu 0,1X soluție Ringer modificată. Embrionii se păstrează în soluții aerate. Pentru rezultate bune nu se pun mai mult de 100 de embrioni într-un vas Petri de 150 mm. Embrionii morți (albicioși) se îndepărtează imediat pentru că pot afecta dezvoltarea celor sănătoși.

Pentru identificarea stadiilor embrionare și larvare, după aspectul exterior se folosesc descrierile lui Nieuwkoop și Faber din 1967. Au fost caracterizate 36 de stadii embrionare și 29 stadii larvare. Stadiile embrionare prezentate mai jos sunt observate la un stereomicroscop, după îndepărtarea învelișului gelatinos și a anvelopei viteline. Se vor ilustra doar stadiile reprezentative, păstrând numerotarea originală dată de Nieuwkoop și Faber.

Stadiul 1: Zigot – (Fig.23A).

Stadiul 2: Două blastomere (1 oră și 30 minute) (Fig.23B).

Stadiul 3: Patru blastomere (2 ore) (Fig.23C).

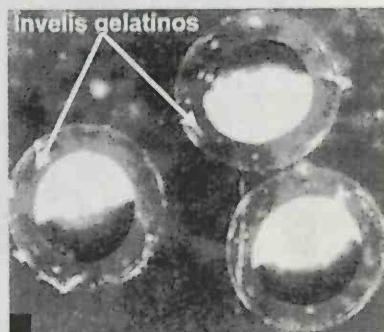


Fig.22. Ovule înconjurare de înveliș gelatinos. X16.

Stadiul 1: Zigot – (Fig.23A).

Stadiul 2: Două blastomere (1 oră și 30 minute) (Fig.23B).

Stadiul 3: Patru blastomere (2 ore) (Fig.23C).

Stadiul 6: 32 blastomere (3 ore) (Fig.23D).

Stadiul 10: Gastrulă timpurie (9 ore)

Apare blastoporul (Fig.23E).

Stadiul 11: Gastrulă avansată (11 ore și 45 minute)

Embrionul apare pigmentat deoarece micromerele pigmentate din emisfera animală acoperă macromerele nepigmentate din emisfera vegetativă. Doar dopul vitelin rămâne nepigmentat, el fiind reprezentat de macromere vegetative (Fig.23F).

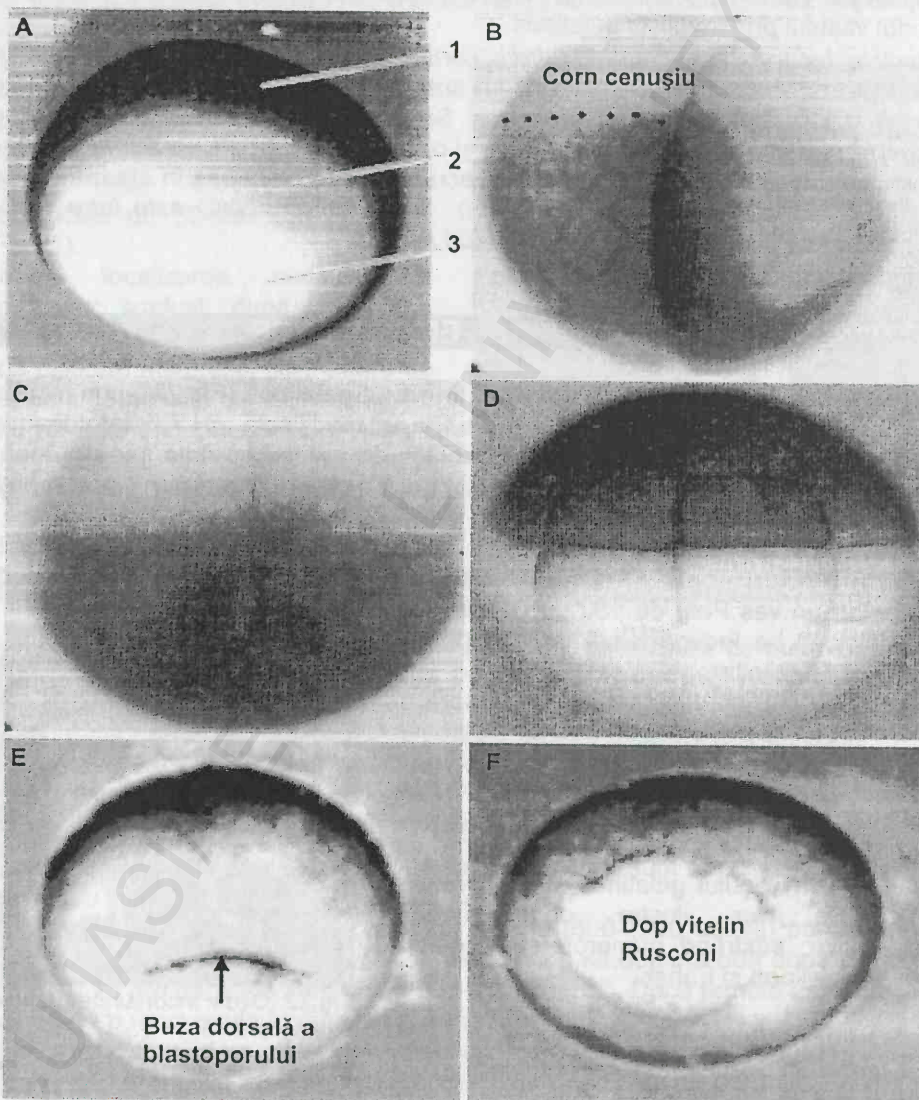


Fig. 23. Dezvoltarea embrionară la *Xenopus laevis*. A-Zigot. B-Două blastomere. C-Patru blastomere. D-32 de celule. 1-Regiune animală pigmentată. 2-Corn cenușiu. 3-Regiune vegetativă. E-Gastrulă timpurie. F-Gastrulă avansată (vedere ventrală).

Stadiul 14: Lamă medulară (16 ore și 25 minute)

Se inițiază formarea jgheabului neural. Embriunul are o lungime de 1,5-1,6 mm. (Fig.24A).

Stadiul 16: Jgheab neural (18 ore și 25 minute)

Lama medulară anterioară este rectangulară. Apare o constricție la mijlocul lamei medulare (Fig.24B).

Stadiul 18: 3-4 somite (19 ore și 45 minute)

Tubul neural este închis parțial. La nivelul regiunii posterioare este prezent încă jgheabul neural. În regiunea anterioară se formează 3-4 somite (Fig.24C).

Stadiul 22: 10 somite (24 ore)

Apar protuberanțe distincte la nivelul ochilor. Se delimitează o adâncitură între viitoarea regiune a maxilarului și cea a branhiilor. Lungimea embrionului este de 2-2,2 mm (Fig.24D).

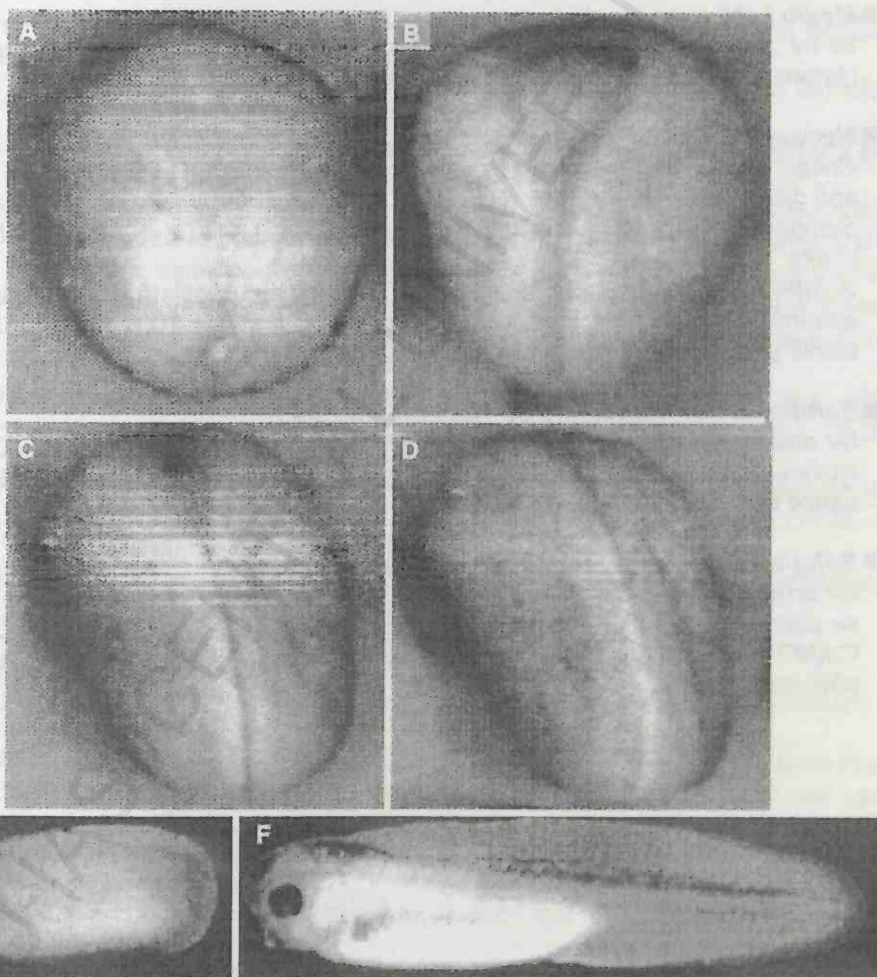


Fig. 24. Dezvoltarea embrionară la *Xenopus laevis*. **A**-Lamă medulară. **B**-Jgheab neural. **C**-3-4 somite. **D**-10 somite. **E**-19 somite. **F**-Larvă. Embrionii sunt fotografiați la mărimi diferite.

Stadiul 27: 19 somite (1 zi, 7 ore și 25 minute)

Înotătoarea este translucidă, cu excepția regiunii din spatele anusului. Formarea mugurelui cozii este accentuată lateral. Sunt prezente 19 somite. Lungimea embrionului este de 3,4-3,7 mm (Fig.24E).

Stadiul 37/38: Larvă (2 zile, 5 ore și jumătate)

Melanofori pe coadă. Lungimea 5,6-6,2 mm (Fig.24F).

V. MEDII ȘI SOLUȚII

■ *ELS de 10X concentrată*

Se amestecă 70 g NaCl; 18 g Tris bază. Se adaugă apă la 700 ml și se ajustează pH-ul la 7,6. Se adaugă 0,75 g KCl; 2 g NaHCO₃; 2 g MgSO₄·7H₂O; 0,8 g Ca(NO₃)₂·4H₂O; 0,6 g CaCl₂·2H₂O. Se aduce la volum final de 1 litru.

■ *Mediu L-15*

50 ml mediu L-15 (Sigma); 5 ml 300 mM HEPES, pH 7,9; 1 ml 100 mM soluție glutamină; 0,1 ml 50 mg/ml gentamicină; 90 ml apă distilată sterilă.

■ *Mediu OR2*

Soluție stoc I: 42,2 g NaCl; 1,85 g KCl; 1,4 g Na₂HPO₄; 11,9 g HEPES; 1000 ml apă distilată sterilă, pH 7,8.

Soluție stoc II: 1,45 g CaCl₂·2H₂O; 2,05 g MgCl₂·6H₂O; 1000 ml apă distilată sterilă.

Soluție de lucru: 100 ml soluție stoc I, 700 ml apă distilată. Se amestecă și se adaugă 100 ml soluție stoc II. Se completează până la 1000 ml cu apă distilată sterilă și se verifică pH-ul, care trebuie să fie 7,8.

■ *Soluție Ringer modificată de 10X concentrată*

Se amestecă 58,4 g NaCl și 12 g HEPES. Se adaugă apă până la 700 ml și se ajustează pH-ul la 7,6. Se adaugă 1,5 g KCl; 2,4 g MgSO₄·7H₂O; 0,4 g EDTA. Se aduce la 1 litru.

■ *Soluție salină Barth modificată de 10X concentrată*

Se amestecă 51,3 g NaCl și 23,8 g HEPES; se adaugă apă distilată la 700 ml și se ajustează pH-ul la 7,5 cu NaOH. Se adaugă 0,75 g KCl; 2 g NaHCO₃; 0,8 g Ca(NO₃)₂·4H₂O; 0,6 g CaCl₂. Se aduce la volum final de 1 litru cu apă distilată și se păstrează la 4°C.

Gallus domestica



Embrionii de pasăre reprezintă organisme model pentru studierea dezvoltării vertebratelor datorită următoarelor aspecte:

- ☺ Se pot obține în număr mare și relativ ieftin ouă fecundate de la fermele de păsări;
 - ☺ Dezvoltarea embrionară se desfășoară în afara organismului matern și din acest motiv embrionii pot fi manipulați cu ușurință;
 - ☺ Există numeroase informații, atât clasice cât și moleculare despre embriogeneza la păsări. Incubarea artificială a ouălelor de găină datează de pe vremea celei de-a 18 dinastii a Egiptului (~1400 î.e.n) și probabil se practica mai devreme în China antică. Primele observații asupra embrionilor de găină sunt atribuite lui Hippocrat (~430 î.e.n.) deși Aristotel a furnizat primele date semnificative (~350 î.e.n.);
 - ☺ Dezvoltarea embrionară la găină poate fi inițiată sau oprită prin simpla schimbare a temperaturii de incubare de la 10-14°C (stocare), la 38°C (incubare), cel puțin în primele două zile ale dezvoltării;
 - ☺ Embrionul se dezvoltă relativ repede, atingând stadiul de 10 somite la două zile de incubare. Embrionii de prepeliță se dezvoltă mai rapid (19-20 zile) ,comparativ cu cei de găină (20-21 de zile);
 - ☺ Manipulările experimentale sunt realizate ușor până în a 8-a zi embrionară, moment în care toate sistemele de organe au fost stabilite;
 - ☺ Au fost elaborate metode de identificare a genelor embrionare;
 - ☺ Se pot genera mutații;
- Cu toate acestea, embrionul avian nu este un model perfect, deoarece are următoarele limite:
- ☺ În momentul depunerii oului, discoblastula este mică (2 mm diametru) și celulele care au destine diferite sunt așezate unele lângă altele. Acest aspect face izolarea lor foarte dificilă;
 - ☺ Celulele sunt mici și în consecință injectările intracelulare sunt practic imposibil de realizat;
 - ☺ Celulele conțin vitelus și embrionii nu sunt așa de transparenți ca cei de la peștele zebură;
 - ☺ Deoarece segmentarea începe în oviduct, imediat după fecundare, stadiile foarte timpurii (până la formarea discoblastulei) nu sunt accesibile manipulării experimentale;

- ⊗ Manipularea embrionului în stadiul de neurulă induce invariabil defecte ale tubului neural, dacă nu sunt luate precauții speciale;
- ⊗ Embrionii timpurii sunt foarte mici, fragili și sensibili la multe substanțe;
- ⊗ Experimentele genetice sunt limitate. Găina are ~80 de cromozomi, mulți fiind microcromozomi, care sunt dificil de distins unii de alții. Majoritatea genelor transcrise se află pe acești cromozomi;
- ⊗ Deși au fost realizate găini transgenice, metodele sunt mai laborioase decât la șoarece și costurile menținerii stocurilor transgenice face imposibilă această tehnologie, cu excepția scopurilor agricole;

I. OBTINEREA STADIILOR EMBRIONARE

Ouăle de pe piață nu conțin embrioni viabili pentru că nu sunt fecundate. Odată obținute, ouăle fertile pot fi stocate la 10-14°C, până la 5-7 zile înaintea incubării. Ele se păstrează în suporturi, cu vârful ascuțit în sus, într-o cutie închisă, pentru a minimaliza pierderea CO₂.

Pentru a iniția embriogeneza, oul se plasează orizontal, într-un incubator la 38°C. Menținerea unei atmosfere umede se realizează prin introducerea unui recipient mare cu apă distilată. Dacă perioada de incubare dorită este mai mare de 48 de ore, oul trebuie rotit pentru a împiedica adeziunea membranelor viteline la membranele cojii, aspect care afectează dezvoltarea. Există incubatoare care fac automat acest lucru de câteva ori pe zi. În lipsa unui astfel de incubator, operația se face manual, în număr impar (de exemplu, trei) pe zi, astfel încât embrionii să-și petreacă nopțile alternativ pe câte o parte. Oul se rotește cu 180°, pe axa lungă. În crescătorii, ouăle se răsucesc din 2 în 2 ore.

După incubare, oul poate fi menținut la temperatura camerei, câteva ore, până la folosire. Embrionii tineri rezistă mai bine la temperatura camerei decât cei avansați. După a treia zi de incubare, embrionii ar trebui supuși experimentelor doar 2-4 ore de la scoaterea din incubator. Pentru că oul se răcește, inima își încetinește ritmul sau se oprește; aceasta nu înseamnă că embrionul este mort. Se verifică viabilitatea prin încălzirea oului la 38°C.

În momentul depunerii, oul de găină a petrecut 20 de ore din embriogeneza în oviduct. Din acest motiv, oul proaspăt depus se află în stadiul de blastulă (de obicei stadiile IX-X, embrion cu aria pellucida formată, iarna). Vara, oul este reținut o perioadă mai lungă și poate fi în stadii mai avansate (de obicei în stadiile XII-XIII, embrioni cu hipoblast format).

Nu se obțin embrioni după incubare sau aceștia nu ajung să eclozeze din următoarele motive: (1) ouă nefecundate; (2) stocul parental este bolnav sau hrănit necorespunzător; (3) oul este prea vechi sau păstrat în condiții neadecvate înainte de incubare. Nu se stochează mai mult de 7-10 zile înainte de incubare; (4) coaja a fost contaminată; (5) temperatura de incubare prea ridicată, prea scăzută sau prea variabilă; (6) umiditate prea ridicată sau prea scăzută în incubator; (7) oul nu a fost răsucit de un număr suficient de ori; (8) ventilație necorespunzătoare, ce conduce la epuizarea oxigenului; (9) manipulare brutală. Manipularea excesivă și lovirea oului în timpul răsucirii, în special în prima săptămână de incubare poate afecta dezvoltarea.

II. CULTIVAREA EMBRIONILOR

Există patru metode de cultivare a embrionilor de găină: (1) cultivarea în coajă sau *in ovo*; (2) cultivarea după îndepărtarea cojii sau "cultura fără coajă"; (3) cultivarea pe anvelopa vitelină; (4) cultivarea pe un cheag de plasmă sau agar (Selleck, 1996).

Alegerea metodei de cultivare depinde de următorii factori: (1) vârsta embrionului la începutul experimentului; (2) durata culturii; (3) scopul experimentului. Pentru embrionii tineri, cele mai folosite culturi pe termen lung sunt cultura *in ovo* și cultura pe membrana vitelină. Pentru cultivarea embrionilor de găină se folosesc două soluții saline: soluția salină Pannett-Compton și soluția salină Tyrode. Soluția salină Pannett-Compton se utilizează în special pentru experimente în care vitelusul este imersat complet într-un volum mare de lichid. Soluția salină Tyrode este recomandată pentru disecarea diferitelor părți ale embrionului. Laboratoarele americane tind să folosească soluția salină Howard-Ringer. Unii cercetători (Stern, 1993) consideră că embrionii se dezvoltă mai bine în soluția salină Pannett-Compton sau Tyrode, decât în soluția Howard-Ringer.

Toate operațiile se realizează cu instrumente și soluții sterile.

A. Cultura *in ovo*

Avantajele metodei sunt următoarele: (1) structurile suport ale oului, de tipul cojii, membranelor cojii, albușului și chalazei sunt vitale pentru menținerea condițiilor optime, asigurând protecție și suport pentru țesuturile extraembrionare; (2) coaja este o sursă importantă de calciu pentru formarea elementelor scheletice; (3) embrionii cultivați în acest fel pot ajunge la ecloziune, după manipularea experimentală.

Dezavantajul major al culturii *in ovo* este acela că stadiile embrionare timpurii sunt foarte sensibile la injectarea colorantului. Procentul de embrioni care supraviețuiesc este scăzut sau embrionii sunt anormali.

Au fost descrise două metode prin care embrionii pot fi accesați și cultivați *in ovo*. Aceste tehnici sunt foarte bune pentru embrioni de 1-2 zile de incubare. Când se aplică embrionilor mai avansați se are în vedere împiedicarea distrugerii țesuturilor extraembrionare.

Protocolul experimental 1

1. Se șterge oul cu vată umezită în etanol 70% și se plasează orizontal în suport. *Coaja nu trebuie să fie îmbibată în etanol, deoarece embrionii mor.*
2. Cu o seringă de 3 ml, cu ac hipodermic, se înțeapă ușor capătul rotunjit al oului (la nivelul camerei cu aer), sub regiunea ecuatorială și se extrage ~1,5-2,5 ml albuș. Acest procedeu conduce la formarea unui spațiu între embrion și membrana cojii, ce permite îndepărtarea cojii fără lezarea embrionului (Fig.25A-C). Pentru a evita distrugerea vitelusului (gălbenușul), odată pătruns prin coajă, acul se orientează aproape vertical (Fig.26A).
3. Se aplică două benzi adezive de 6 cm pe toată lungimea superioară a oului;
4. Se realizează o fereastră în ou, prin tăierea cu un foarfece, a unui cerc de 2 cm, în coaja acoperită cu bandă adezivă. Prin această fereastră va fi manipulat embrionul (Fig.26B);
5. Se pipetează cu grijă soluție salină (Tyrode sau Ringer pentru păsări) pe discul embrionar, pentru a-l păstra umed.
6. Pentru o mai bună vizibilitate, se poate injecta sub discul embrionar soluție colorantă (cerneală diluată cu soluție salină). În acest scop se rotește oul până ce

capetele discului embrionar apar în fereastră. Cu o seringă cu ac 25G5/8 se penetrează membrana vitelină, în afara ariei opace și se introduce acul, paralel cu embrionul, astfel încât vârful său să fie dispus la 1 mm sub centrul discului embrionar. Se injectează ușor cerneală până ce embrionul devine vizibil peste fondul roșu (Fig.26C ; Planșa I1). Oul poate fi observat la microscop, unde se pot realiza experimentele dorite.

7. După manipulare, embrionul se umezește cu puțină soluție salină, se acoperă fereastra cu două benzi adezive (Fig.26D) și se plasează în incubator la 38°C.

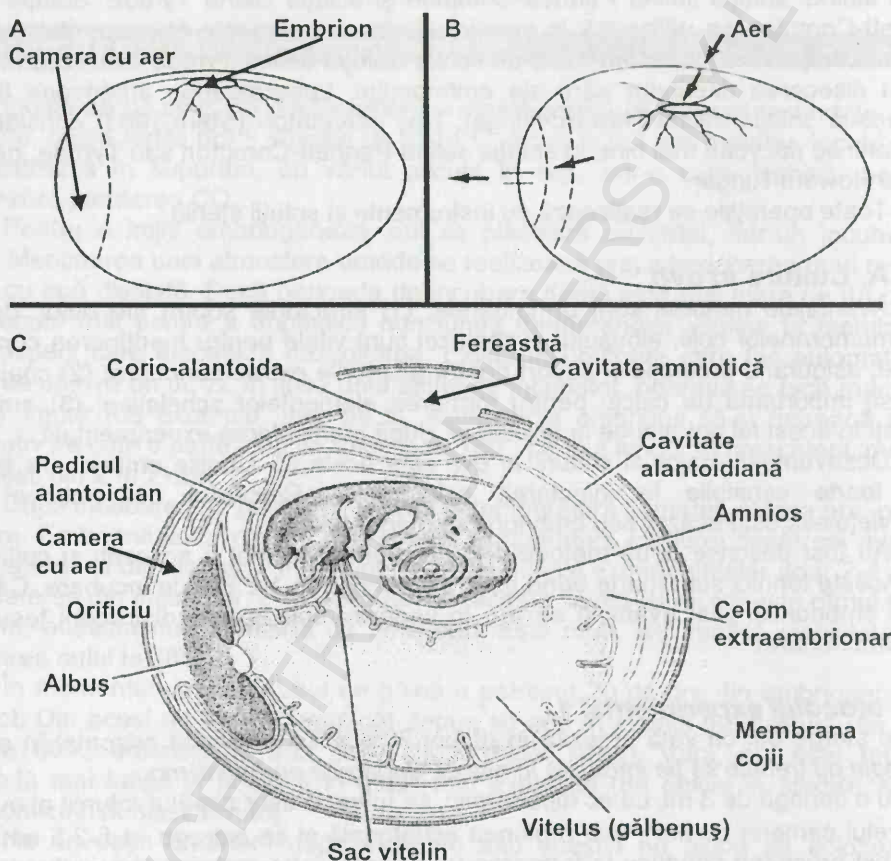


Fig.25. A-Poziția embrionului în ou. B-După realizarea unui orificiu la nivelul camerei cu aer și îndepărtarea cojii, aerul pătruns prin partea superioară (săgeți) iese la nivelul camerei cu aer, determinând lăsarea embrionului. C-Schema structurii unui ou la 9 zile de incubare.

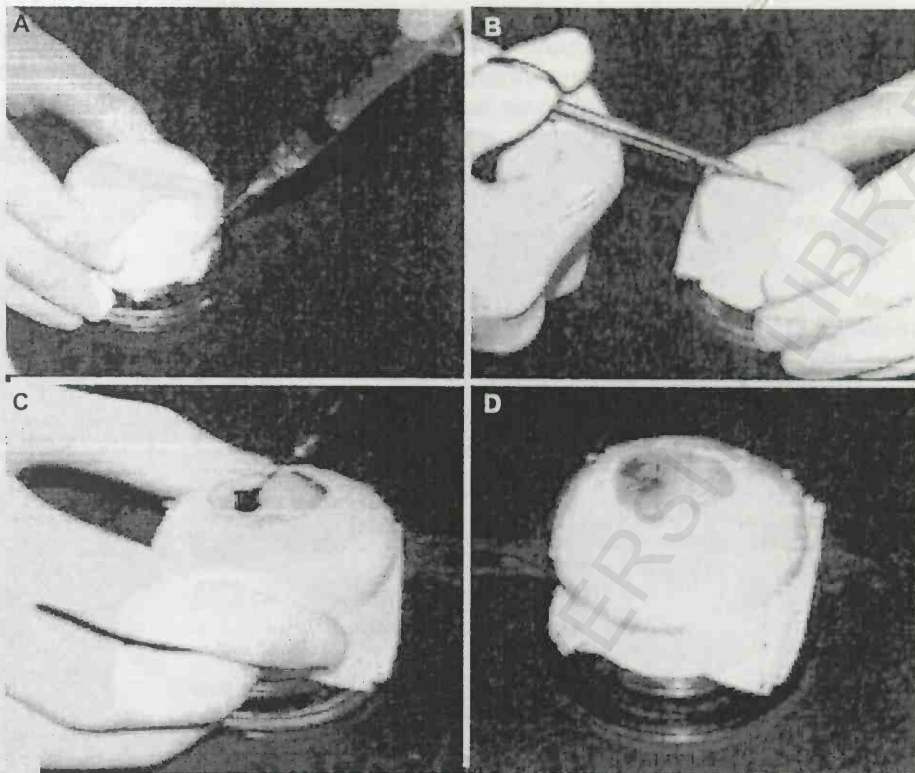


Fig.26. Tehnică de accesare a embrionului de găină *in ovo* (Protocol experimental 1).

Protocol experimental 2

Pentru unele operații, accesarea oului prin metoda de mai sus nu este corespunzătoare, deoarece există o cantitate insuficientă de soluție salină deasupra embrionului. În consecință, efectele tensiunii de suprafață pot face operațiile de grefare dificile. În plus, nu pot fi folosite unele microscopie, care necesită prezența pe embrion a unui bulă de aer sau a soluției saline.

1. Se șterge oul cu 70% etanol și se extrage albușul din capătul rotunjit ca mai sus (Fig.27A).
2. Cu o pensă, se taie în partea superioară a cojii un pătrat cu latura de 1 cm, prin aplicarea unei presiuni și a unor lovituri ușoare (Fig.27B).
3. Se umezește membrana cojii cu puțină soluție salină și se înlătură pentru a realiza o fereastră deasupra embrionului (Fig.27C).
4. Se aplică un strat de 1 mm vaselină sau silicon pe marginile ferestrei (Fig.27D);
5. Se pipetează suficientă soluție salină în ou, astfel încât vitelusul să plutească. Acest procedeu determină ridicarea embrionului. Se continuă pipetarea soluției saline pe embrion, până când se formează o bulă de lichid, care va fi reținută la marginile ferestrei de către stratul de vaselină. Pentru vizualizarea embrionului se poate injecta cerneală sub embrion ca mai sus (Fig.27E).
6. După manipularea experimentală se scoate cu o seringă ~2 ml soluție salină/albuș, din capătul rotunjit, operație ce determină lăsarea embrionul în ou;
7. Se îndepărtează vaselina de la capetele ferestrei și se șterge coaja cu 70% etanol (Fig.27F);

8. Se sigilează fereastra cu bandă izolatoare de 5-6 cm (Fig.27G) și se plasează oul în incubator la 38°C.

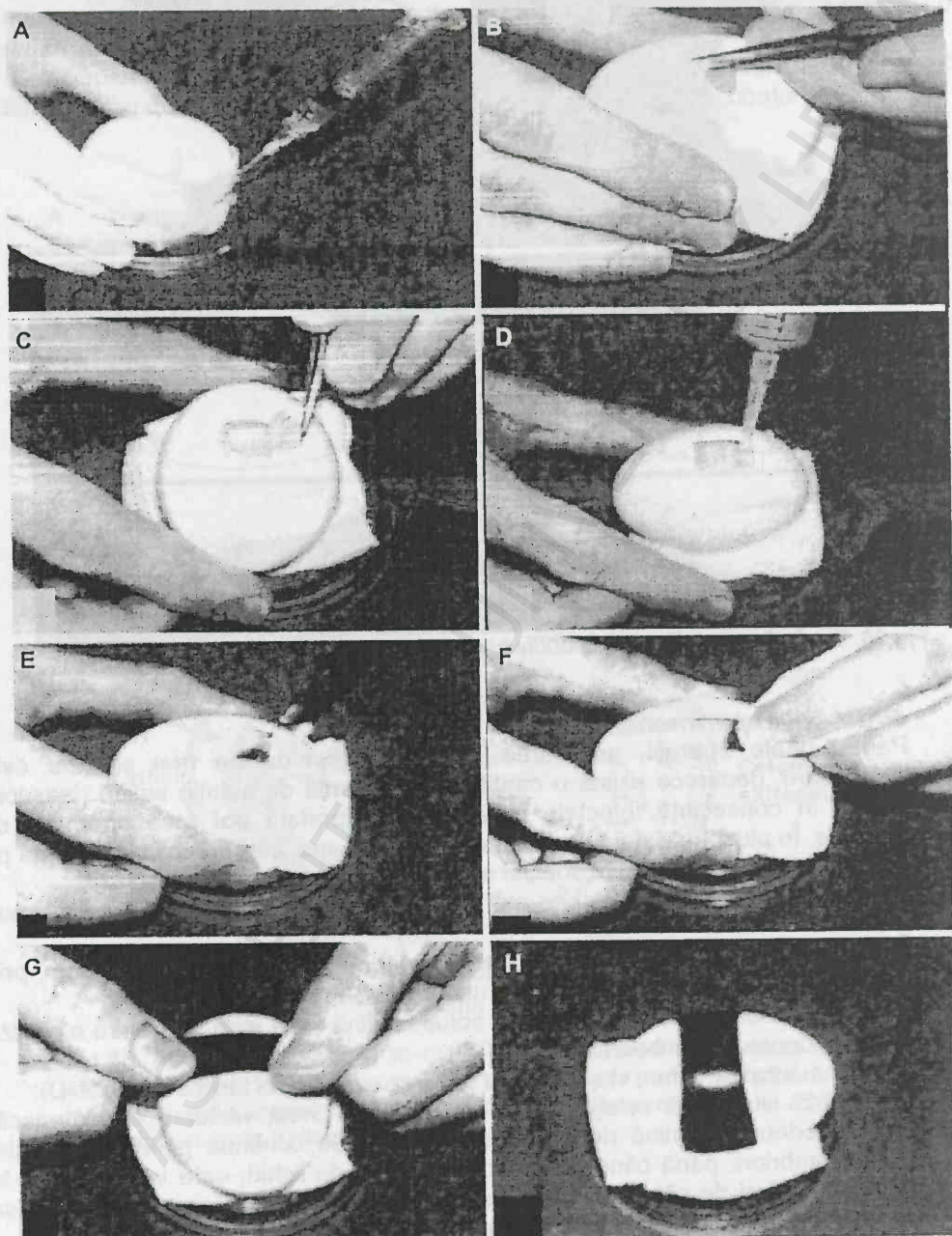


Fig.27. Protocol experimental 2 de accesarea a embrionului *in ovo*.

În afara manipulărilor experimentale, în laboratorul nostru accesarea *in ovo* se realizează pentru observarea sistemului circulator al sacului vitelin, numit omfalomezenteric (Fig.28) sau pentru injectarea unei soluții de Annexin V, în scopul detectării apoptozei embrionare. În acest caz se realizează o fereastră largă deasupra embrionului.

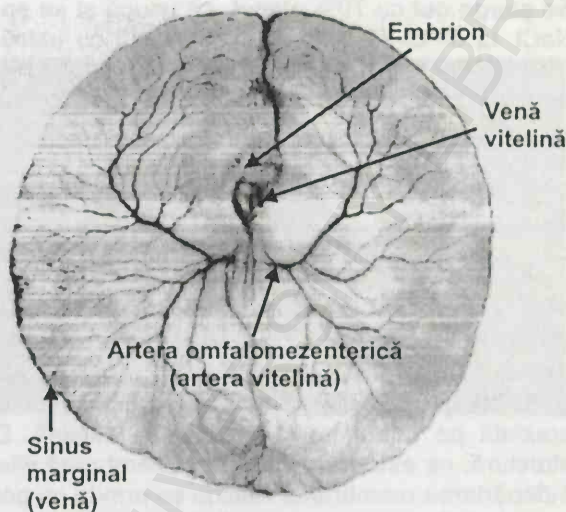


Fig.28. Embrion de găină la 3 zile jumătate de incubare.

B. Cultura fără coajă

Este o metodă folosită pentru manipulările blânde (de tipul grefelor corioalantoidiene) și pentru testarea diferitelor substanțe teratogene. Spre deosebire de cultura în coajă, prin acest tip de cultură embrionii nu pot ajunge la ecloziune. În plus, majoritatea culturilor fără coajă folosesc ouă preincubate 72 de ore. În unele cazuri, oul neincubat poate fi cultivat fără coajă, însă doar pentru perioade scurte de timp (3-4 zile). Transferul ulterior într-o coajă surogat permite embrionilor să eclozeze. Metoda a fost folosită pentru a genera păsări transgenice.

C. Cultura pe suport de plasmă sau agar

Metoda nu permite dezvoltarea embrionară normală, deoarece lipsește membrana vitelină.

O metodă ușoară de a cultiva discul embrionar până în stadiul de 20/30 somite este aceea de a-l plasa direct pe un suport nutritiv solid, realizat din plasmă sanguină sau agar. Waddington (1932) a folosit un suport din plasmă (trei părți plasmă de găină și o parte extract embrionar de găină). În prezent se folosește ca substrat agarul, pentru cultivarea embrionilor în stadiu de gastrulă timpurie și neurulă (Schoenwolf, 1995).

Discul embrionar este plasat cu endodermul pe suport și cultivat la 37°C, 100% umiditate și în prezență de 5% CO₂.

Dezavantajul major al acestei metode este acela că discul embrionar nu se dezvoltă pe substrat la fel cum o face pe membrana vitelină. S-a raportat că mișcările morfogenetice ale embrionilor cultivați în acest mod sunt anormale. În plus, există o

incidență mare de anomalii ale tubului neural în acest tip de cultură, mai ales dacă aria opacă nu a fost îndepărtată corespunzător.

Protocol experimental

Se pot folosi embrioni de 18, 24, 33 și 49 ore de incubare. Operațiile experimentale se realizează cu mânuși chirurgicale.

1. Se șterge oul cu 70% etanol, se usucă și se sparge într-un vas ce conține 0,72% NaCl, la 38°C. Operația se realizează cu atenție, pentru a nu sparge gălbenușul (fragilitatea lui crește odată cu durata de incubare). *Spargerea gălbenușului opacizează soluția salină și embrionul este pierdut.* Pentru a evita aceste probleme se lovește oul de marginile vasului, se imersează în soluția salină și se separă cele două jumătăți.
2. Se manipulează cu vârfurile degetelor gălbenușul, până ce discul embrionar este situat deasupra.
3. Se prinde periferia discului embrionar (aria opacă) cu pensa și cu un foarfece fin se secționează de jur împrejur.
4. După secționare, se prinde ușor cu pensa discul embrionar și se lasă să plutească deasupra gălbenușului.
5. Se ridică ușor marginile discului embrionar cu pensa, se introduce o linguriță sub el și se transferă într-un vas Petri cu soluție salină proaspătă. Discul embrionar prezintă pe fața dorsală membrana vitelină. Deși aceasta apare ca o singură structură, ea este formată dintr-o membrană vitelină internă și una externă. Pentru îndepărtarea membranei viteline se prinde cu pensa marginile discului embrionar și se flutură în sus și în jos, până când membrana vitelină plutește (mișcările sunt similare scuturării unui cearșaf).
6. Cu o pipetă Pasteur sterilă se transferă discul embrionar într-un vas de cultură de plastic (35 x 10 mm) și se poziționează cu pense sterile pe mediul solid agar/albuș, fie cu fața dorsală în sus, fie în jos. Se îndepărtează cât mai mult din aria opacă, astfel încât să rămână doar o margine subțire, atașată de aria pellucida. Această operație se realizează cu un cuțit confecționat dintr-o lamă de ras¹⁰.

D. Cultura pe membrana vitelină

Cea mai cunoscută este cultura New¹¹, prin care discul embrionar este cultivat pe membrana vitelină, plasată pe un inel de sticlă, așezat pe o suprafață de albuș subțire (Fig.29). Inelul de sticlă folosit de New avea un diametru exterior de 33 mm și unul interior de 28 mm. În prezent se folosesc inele de sticlă cu un diametru exterior de 27 sau 30 mm și o înălțime de 4-5 mm. În ultimii ani au fost aduse numeroase modificări adaptate scopurilor experimentale. Metoda se folosește pentru cultivarea embrionilor timpurii, din stadiul de neurulă, până în stadiul de 19 perechi de somite.

Metoda are mai multe avantaje: (1) embrionii pot fi studiați ușor la microscop; (2) atât fața dorsală cât și cea ventrală ale embrionului sunt accesibile manipulării; (3) pot fi realizate incizii adânci, care să penetreze toate foițele embrionare. Operațiile similare *in ovo* determină scurgerea vitelusului prin orificiul realizat și moartea embrionului; (4) este folositoare pentru studiile teratologice, deoarece embrionul este accesibil pentru aplicarea substanțelor toxice; (5) permite expansiunea discului

¹⁰Se taie bucăți din lama de ras, cu vârfuri ascuțite și se montează într-o baghetă de lemn.

¹¹Elaborată de Dennis New și descrisă prima dată în 1955.

embrionar pe membrana vitelină și formarea ulterioară a unei arii vasculare normale. În momentul în care marginile discului embrionar ating marginile interne ale inelului, expansiunea este împiedicată, dezvoltarea este blocată și embrionul moare. Aceasta înseamnă că embrionii pot fi cultivați doar perioade scurte, între 24-36 de ore. Embrionii care au câteva perechi de somite nu pot fi plasați în cultura New, deoarece embrionul este de mărimea inelului de cultură.

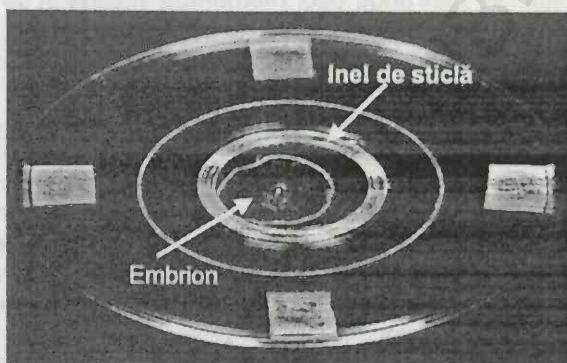


Fig.29. Cultura New după 24 de ore de incubare

Protocol experimental 1

Această metodă diferă de cea originală a lui New și se bazează pe modificările aduse de Stern și Ireland în 1981 și de Stern în 1993. Inelele de sticlă folosite de New erau circulare în secțiune transversală, în timp ce cele din metoda prezentată mai jos sunt tăiate din tuburi de sticlă, fiind dreptunghiulare în secțiune transversală. Această modificare permite ansamblului format din inel/membrană vitelină/blastoderm să fie transferat din sticla de ceas (în care New și-a cultivat embrionii) în plăci Petri de plastic.

1. Se șterge oul cu 70% etanol și se usucă.
2. Se ține oul cu capătul rotunjit în sus și se sparge ușor coaja cu un foarfece. Se îndepărtează coaja și membranele cojii.
3. După îndepărtarea unei pătrimi din coajă, se înclină oul pentru a scurge albușul, care va fi păstrat pentru etapele ulterioare.
4. Albușul gros este mai dificil de îndepărtat și poate fi separat de vitelus cu ajutorul penselor. *Această operație se realizează cu atenție, astfel încât membrana vitelină ce înconjoară vitelusul să nu fie afectată.* Se continuă îndepărtarea cojii și scoaterea albușului, până ce coaja rămâne sub forma unei cupe, în care se află vitelusul. Cu cât se îndepărtează mai mult albuș gros în acest stadiu, cu atât mai ușoare vor fi etapele ulterioare.
5. Se imersează oul într-un vas ce conține soluție salină Pannett - Compton și se înclină coaja astfel încât gălbenușul să treacă în vas. Se aruncă coaja rămasă și se îndepărtează urmele de albuș.
6. Cu ajutorul penselor se rotește vitelusul până ce embrionul este așezat deasupra. În acest stadiu suprafața gălbenușului trebuie analizată la stereomicroscop pentru a ne asigura că nu există orificii în membrana vitelină, prin care să se scurgă vitelusul. *Orice orificiu în regiunea supraecuatorială a membranei viteline va împiedica dezvoltarea embrionului.*

7. Se înțeapă cu un foarfece membrana vitelină în regiunea ecuatorială a vitelului sau ușor dedesubt. Se rotește ușor vitelul cu o pensă cu vârfuri rotunjite și se sectionează membrana vitelină în jurul regiunii ecuatoriale a gălbenușului, până ce membrana superioară este separată complet de cea de sub regiunea ecuatorială.
8. Se imersează o sticlă de ceas și un inel de sticlă în soluție salină, în apropierea gălbenușului.
9. Se prinde membrana vitelină cu pensele, în două puncte situate la 15 mm unul de altul. Se răsfârâge ușor membrana vitelină și se trag capetele prinse cu pensele în direcții opuse ale masei de vitel, pentru a îndepărta membrana vitelină de gălbenuș. După această operație embrionul este așezat cu partea ventrală pe membrana vitelină.
10. Se așează membrana vitelină pe sticla de ceas submersă și se plasează inelul de sticlă pe centrul membranei viteline, în jurul embrionului.
11. Se scoate sticla de ceas din soluția salină și concomitent se scurge puțină soluție salină din inel. Se plasează sticla de ceas la stereomicroscop.
12. Cu pensele, se trag capetele libere ale membranei viteline peste inelul de sticlă. În acest moment se îndepărtează excesul de membrană vitelină. Cultura este acum disponibilă pentru experimente. Embrionul se menține acoperit cu soluție salină în timpul operațiilor.
13. După terminarea experimentului se îndepărtează cu o pipetă Pasteur soluția salină din inelul de sticlă.
14. Se unge cu albuș subțire fundul și capacul vasului de cultură.
15. Se prind ferm cu pensele marginile inelului de sticlă și se transferă cultura din sticla de ceas în centrul vasului de cultură. Cu pensele se fixează inelul la fundul vasului, se înlocuiește capacul vasului de cultură și se plasează în incubator la 38°C, pentru dezvoltarea ulterioară.

Culturile New tradiționale au fost plasate în vase ce conțineau un substrat de 1 mm agar în loc de albuș subțire. Substratul de agar conținea părți egale de albuș subțire și soluție salină, cu 1% agar și 1% glucoză.

În absența inelelor de cultură se poate folosi în cadrul laboratoarelor cu studenții o metodă alternativă, ce combină cultura pe membrana vitelină cu prezența unui suport solid de agar. Avantajul metodei constă în faptul că permite cultivarea atât a embrionilor tineri cât și a celor avansați.

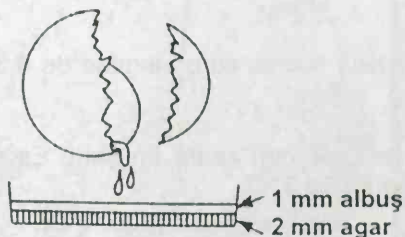
Protocol experimental 2

Pentru acest experiment se folosesc embrioni de 24 de ore.

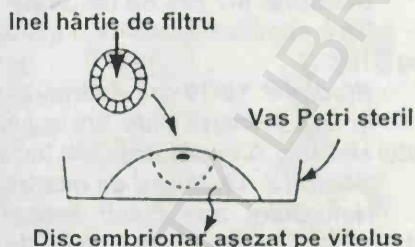
1. Se sparge oul pe linia mediană și se scurge albușul într-un vas Petri acoperit cu 2 mm mediu solid agar-albuș (Fig.30A).
2. Se transferă gălbenușul împreună cu embrionul în alt vas Petri steril (Fig.30B). Cu o pensă se îndepărtează orice urmă de albuș rămasă pe suprafață.
3. Se aplică pe suprafața discului embrionar un inel din hârtie de filtru steril, astfel încât marginile interne ale inelului să înconjoare discul embrionar (Fig.30B).
4. Cu o pensă cu vârfuri rotunjite se presează ușor hârtia de filtru și cu un foarfece se taie membrana vitelină pe conturul inelului. În cursul operației de tăiere se verifică dacă membrana vitelină a aderat de hârtia de filtru (fig.30C).
5. Se desprinde cu o pensă hârtia de filtru împreună cu membrana vitelină și se așează invers în vasul Petri peste mediul solid agar-albuș. Astfel hârtia de filtru este în contact cu mediul solid iar membrana vitelină, deasupra (Fig.30D).
6. Se observă embrionul la stereomicroscop și se realizează experimentele dorite.

7. După realizarea experimentelor se plasează vasul Petri cu embrionul în alt vas Petri mai mare, pe fundul căruia s-a pus hârtie de filtru umezită. Se incubează la 38°C, diferite intervale de timp.

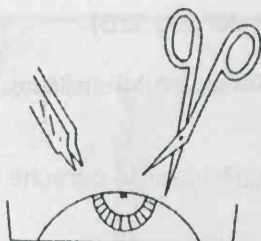
A



B

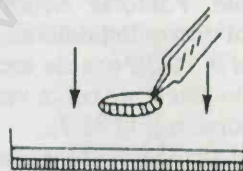


C



Secționare în jurul inelului din hârtie de filtru

D



Plasarea inelului cu discul embrionar atașat în cultură

E

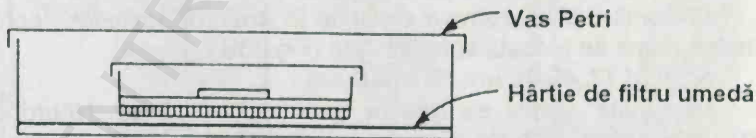


Fig.30. Etapele culturii pe membrana vitelină.

III. OBSERVAREA STADIILOR EMBRIONARE

La găină, identificarea stadiilor embrionare se realizează după două sisteme. Primele 14 stadii embrionare (înaintea formării liniei primitive) au fost descrise de Eyal-Giladi și Kochav în 1974 și notate de la I-XIV. După apariția liniei primitive și până în momentul ecloziunii se folosesc descrierile realizate de Hamburger și Hamilton în 1951, care au caracterizat 45 de stadii (2-46). Se vor ilustra doar stadiile reprezentative, folosite în experimentele realizate în cadrul laboratorului nostru de

Biologia dezvoltării. După izolarea din ou, embrionii au fost fixați în 3,5% paraformaldehidă în tampon fosfat salin cel puțin patru ore și colorați cu roșu carmin saturat în 4% borax, diluat 50/50 cu 70% etanol, deshidratați, clarificați și montați în balsam de Canada.

Stadiul 1: Discoblastulă (Fig.31A).

Stadiul 2: 6-7 ore de incubare

Linia primitivă apare ca o îngroșare conică scurtă, cu o lungime de 0,3-0,5 mm (Fig.31B).

Stadiul 4: 18-19 ore de incubare

În linia primitivă care are o lungime de 1,88 mm apare un șanț. Este prezent nodul Hensen. Aria pellucida are formă de pară (Fig.31C).

Stadiul 5: 19-22 ore de incubare

Notocordul apare sub forma unui bețișor de mezoderm, numit prelungire cefalică, ce se extinde de la nodul Hensen (Fig.31D).

Stadiul 6: 23-25 ore de incubare

Un fald al discului embrionar anterior către notocord marchează capătul anterior al embrionului timpuriu (Fig.32A).

Stadiul 7: 23-26 ore de incubare

O somită. Faldurile neurale vizibile în regiunea capului (Fig.32B).

Stadiul 8: 26-29 ore de incubare

4 somite. Faldurile neurale se unesc la nivelul creierului mijlociu. Insulele sangvine sunt prezente posterior (Fig.32C).

Stadiul 9: 29-33 ore de incubare

7 somite. Sunt prezente veziculele optice primare. Primordiile pereche ale inimii încep să fuzioneze (Fig.32D).

Stadiul 10: 33-38 ore de incubare

10 somite. Prima pereche de somite se dispersează. Prima indicare a flexurii craniene. Cele trei vezicule cerebrale vizibile. Inima se îndoaie ușor spre dreapta (Fig.33A).

Stadiul 11: 40-45 ore de incubare

13 somite. 5 neuomere distincte în creierul posterior. Închiderea neuroporului anterior. Inima se îndoaie spre dreapta (Fig.33B).

Stadiul 12: 45-49 ore de incubare

16 somite. Capul se rotește spre partea stângă. Neuroporul anterior închis. Veziculele optice primare și pediculul optic bine stabilite. Inima are forma literei S (Fig.33C).

Stadiul 14: 50-53 ore de incubare

22 somite. Creierul anterior și posterior formează un unghi aproape drept. Sunt distincte arcurile branchiale 1 și 2. Vezicula optică primară se invaginează. Formarea placodei cristaliniene. Poate fi recunoscută punga Rathke. Amniosul se extinde la nivelul somitelor 7-10 (Fig.33D).

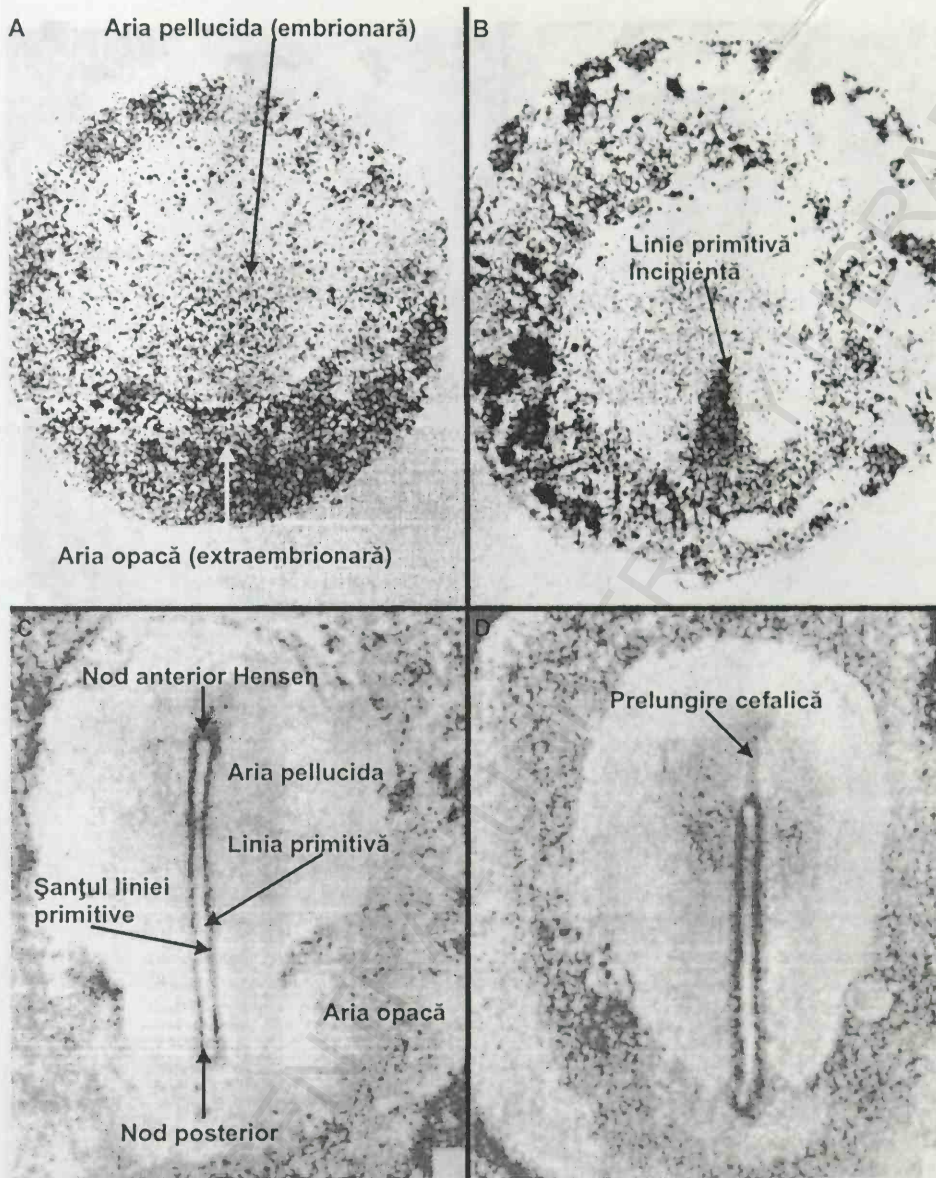


Fig.31. Dezvoltarea embrionară la găină. **A**-Discoblastulă. **B**-Linie primitivă. **C**-Nodul Hensen. **D**-Stadiul 5.

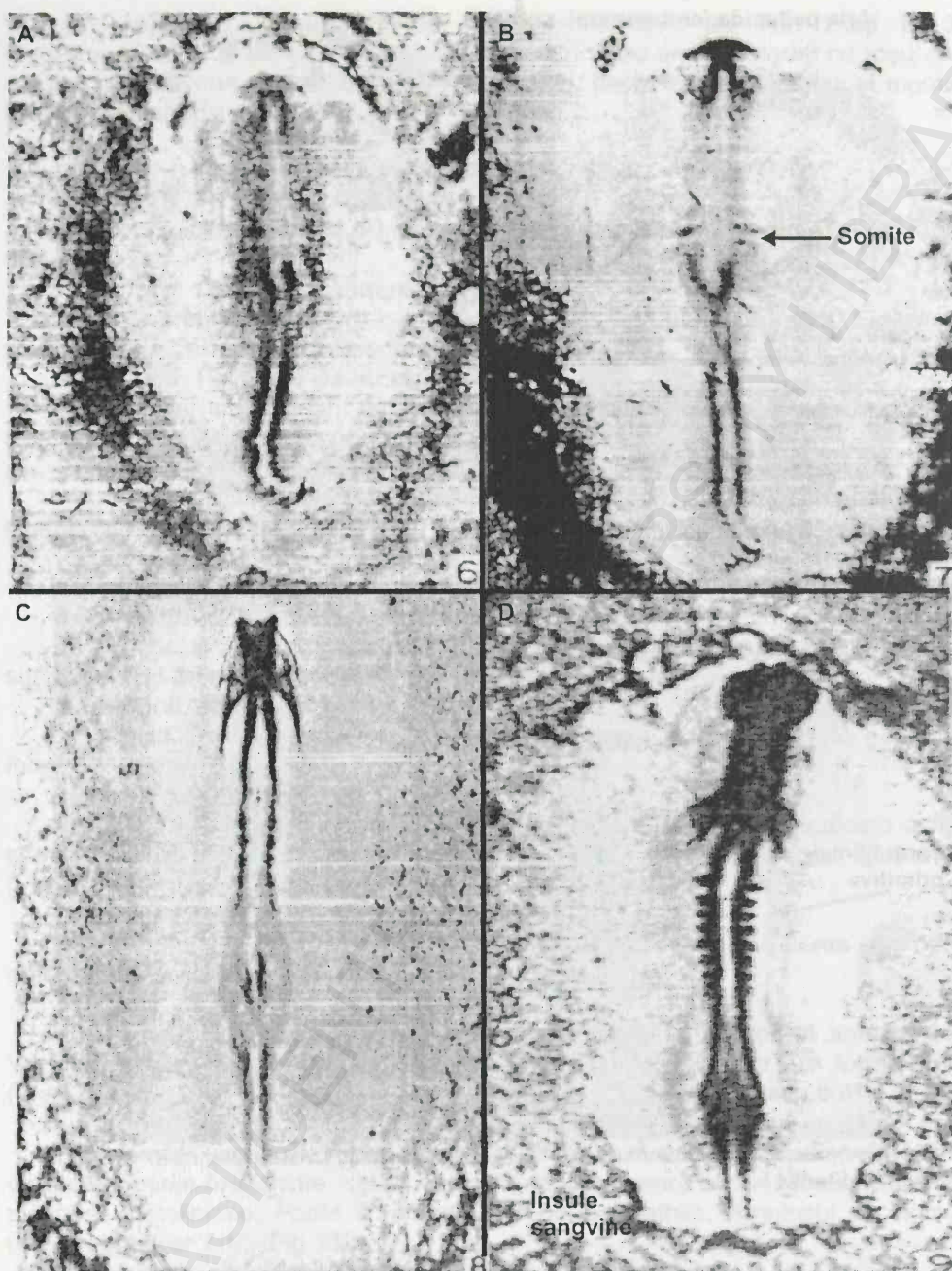


Fig.32. Dezvoltarea embrionară la găină. A-Stadiul 6. B-Stadiul 7. C-Stadiul 8. D-Stadiul 9.

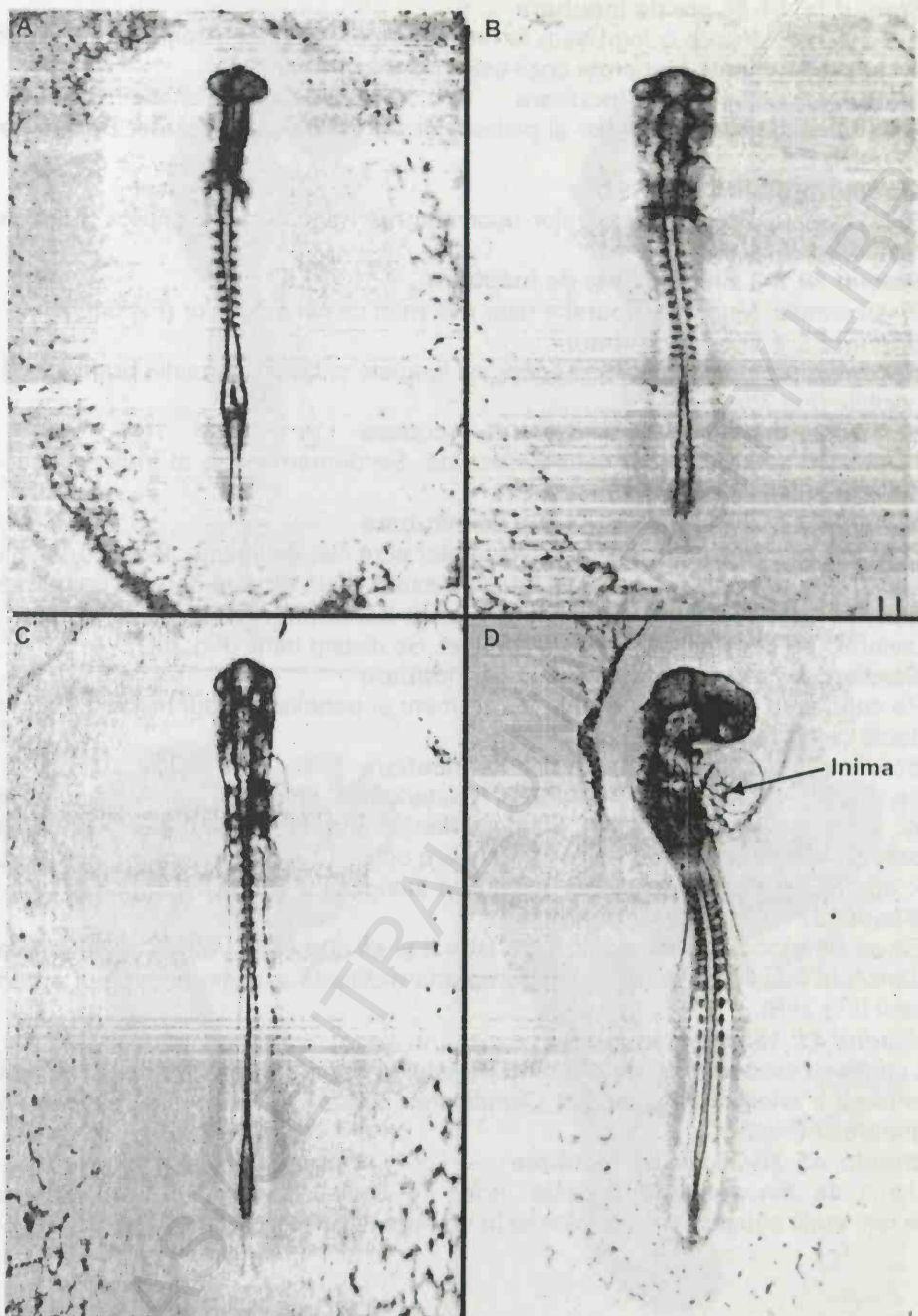


Fig.33 Dezvoltarea embrionară la găină. A-Stadiul 10. B-Stadiul 11. C-Stadiul 12. D-Stadiul 14.

Stadiul 16: 51-56 ore de incubare

26-28 somite. Apare o îngroșare la nivelul viitoarelor aripi. Amniosul se extinde la nivelul somitelor 10-18. Mugurele cozii este mic (Fig.34A).

Stadiul 17: 52-64 ore de incubare

29-32 somite. Mugurii aripilor și picioarelor au aceeași dimensiune, Epifiza este distinctă (Fig.34B).

Stadiul 18: 3 zile de incubare

30-36 somite. Mugurii picioarelor ușor mai mari decât cei ai aripilor. Alantoida este scurtă (Fig.34C).

Stadiul 19: 3-3 zile jumătate de incubare

37-40 somite. Mugurii picioarelor ușor mai mari ca cei ai aripilor (Fig.34D).

Stadiul 23: 4 zile de incubare

Mugurii aripilor și picioarelor au aceeași lungime și lățime. Arcurile branhiale 3 și 4 sunt vizibile (Fig.35A).

Stadiul 25: 4 zile jumătate - 5 zile de incubare

Articulațiile genuchiului și cotului distincte. Se demarchează al treilea deget al piciorului (Fig.35B).

Stadiul 30: 6 zile jumătate - 7 zile de incubare

Cele trei segmente ale aripilor și picioarelor sunt clar delimitate. Există adâncituri distincte între degetele 1 și 2. La nivel branhial există două rânduri dorsale de germeni ai penelor, pe fiecare parte a măduvei spinării și trei rânduri la nivelul picioarelor. O papilă sclerală pe fiecare parte a fisurii coroidei. Se disting dinții (Fig.35C).

Stadiul 33: 7 zile jumătate - 8 zile de incubare

Pe coadă, se disting trei rânduri de germeni ai penelor, rândul mijlociu fiind mai mare decât celelalte (Fig.35D).

Stadiul 35: 8 zile jumătate - 9 zile de incubare

Se disting falangele în membrele posterioare. Germenii penelor sunt mai evidenți. Apar noi germeni lângă linia mediană ventrală, în apropierea sternului. Pleoapele cu aspect elipsoidal încep să acopere ochii. 13 papile sclerale ce formează un cerc aproape complet. Mandibula și gâtul se alungesc (Fig.36A).

Stadiul 37: 11 zile de incubare

Ghearele picioarelor se aplatizează lateral și se curbează ventral. Este marcată clar adâncitura labială pe mandibulă. Membrana nictitantă a ajuns la capătul anterior al corneei (Fig.36B).

Stadiul 41: 15 zile de incubare

Lungimea ciocului este de 4,5 mm. Penele se suprapun pe suprafața inferioară și superioară a aripilor și picioarelor. Cornificarea dorsală și ventrală se extinde spre baza ghearelor (Fig.36C).

Stadiul 45: 19-20 zile de incubare

Jumătate din sacul vitelin este inclus în cavitatea corpului. Corioalantoida conține mai puțin sânge și este lipicioasă în embrionul viu (Fig.36D).

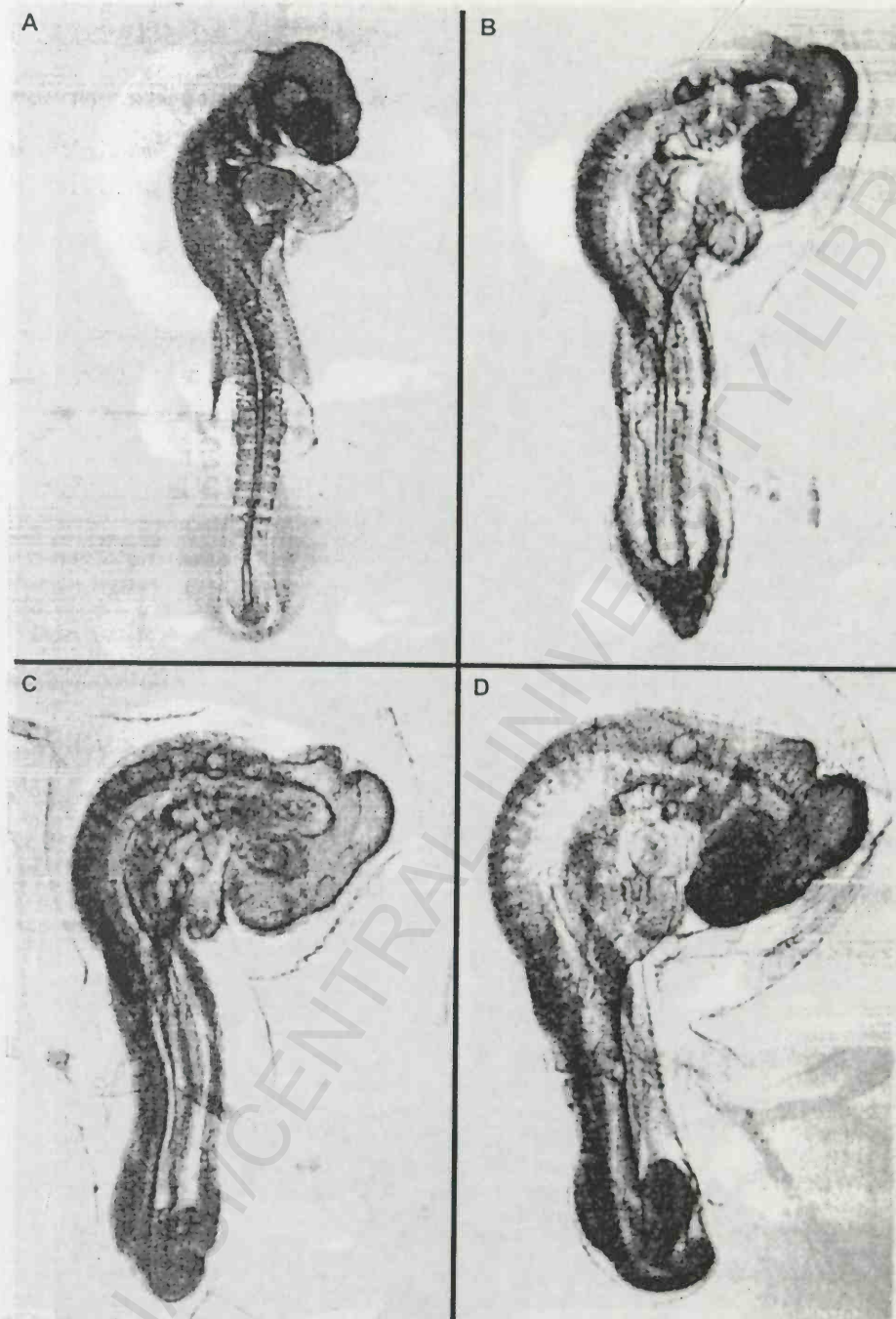


Fig.34. Dezvoltarea embrionară la găină. A-Stadiul 16. B-Stadiul 17. C-Stadiul 18. D-Stadiu 19.

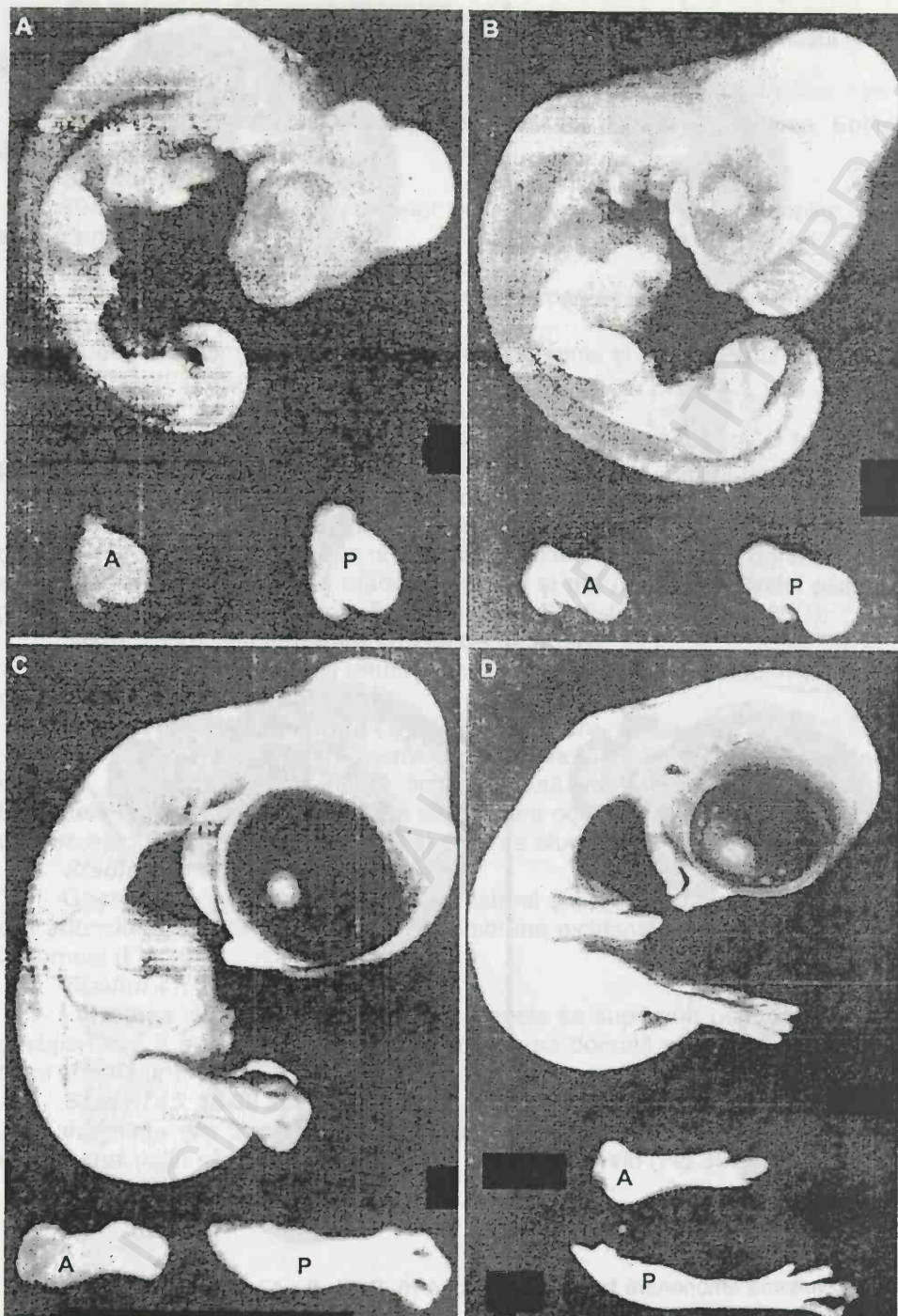


Fig.35. Dezvoltarea embrionară la găină. A-Stadiul 23. B-Stadiul 25. C-Stadiul 30. D-Stadiul 33. A-mugurele aripii; P-mugurele piciorului.

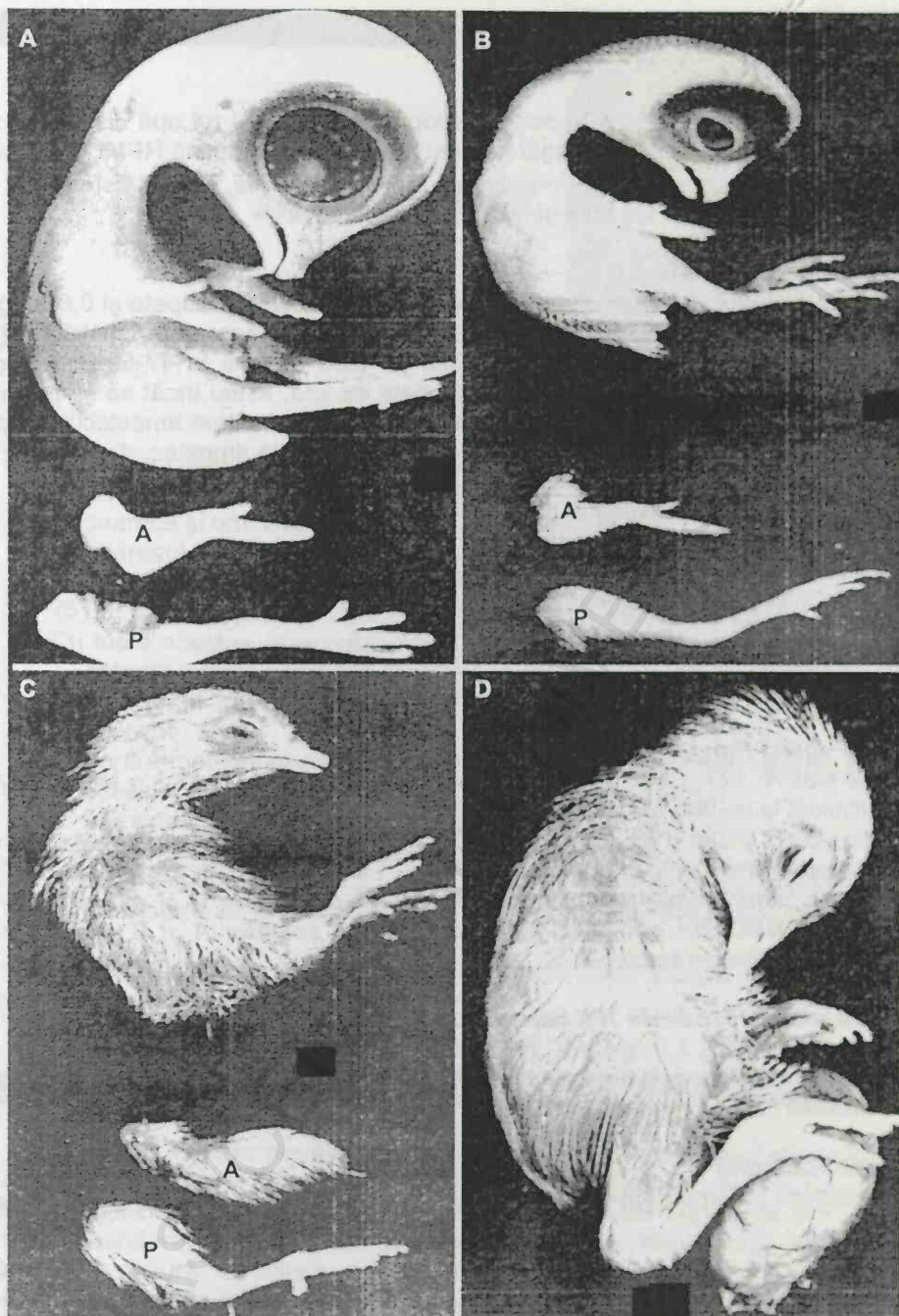


Fig.36. Dezvoltarea embrionară la găină. A-Stadiul 35. B-Stadiul 37. C-Stadiul 41. D-Stadiul 45. A-mugurele aripiei. P-mugurele piciorului.

IV. MEDII ȘI SOLUȚII

■ *Mediu solid de agar*

Se dizolvă 200 mg agaroză cu punct de topire scăzut, în 3 ml apă distilată și se autoclavează. În timp ce se răcește se adaugă 8 ml soluție salină RPMI (Rosewell, Park Memorial Institute) 10 μ l penicilină și 100 μ l glutamină. Mediul este turnat în vase Petri de 35 mm și lăsat să gelifice.

■ *Mediu solid agar - albuș*

Se amestecă părți egale de albuș subțire de la ouă fertile proaspete și 0,6% agar bacteriologic în 123 mM soluție salină sterilă. Soluția de agar este încălzită inițial până la fierbere într-un vas steril și răcită pe baie de apă la 47-50°C. Albușul păstrat în vas steril este plasat în aceeași baie de apă, astfel încât să se permită echilibrarea celor două soluții înaintea amestecării. Se menține amestecul în baie de apă, până la topirea agarului. Se toarnă câte 2,5 ml de amestec albuș - agar în fiecare vas de cultură de plastic. Se acoperă fiecare vas și se păstrează la frigider, în condiții de umiditate, până la folosire.

■ *Soluție Howard - Ringer*

1,44 g NaCl; 0,075 g KCl; 0,46 g $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 200 ml apă distilată.

■ *Soluție salină Ringer*

9 g NaCl; 0,42 g KCl; 0,24 g CaCl_2 ; apă distilată la un litru.

■ *Soluție salină Pannett - Compton*

Soluție stoc A: 121 g NaCl; 15,5 g KCl; 10,42 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 12,7 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; apă distilată la un litru. Se autoclavează înaintea stocării.

Soluție stoc B: 2,365 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,188 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; apă distilată la un litru. Se autoclavează înainte de stocare.

Soluție de lucru: înainte de folosire se amestecă soluțiile A, B și apă distilată în raport de 4:6:90. Se evită amestecarea directă a soluțiilor A și B deoarece se formează precipitate insolubile.

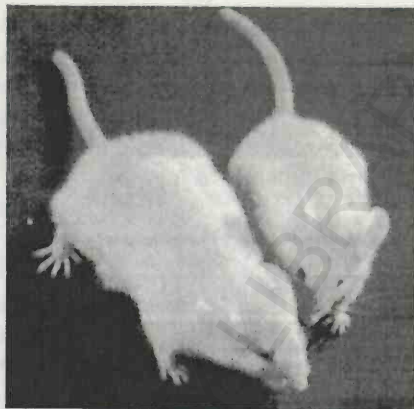
■ *Soluție salină Tyrode de 10X concentrată*

80 g NaCl; 2 g KCl; 2,71 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 g glucoză; la un litru apă distilată. Această soluție poate fi autoclavată și diluată cu apă distilată sterilă înainte de folosire.

■ *Soluție colorantă*

Se amestecă extemporaneu o parte cerneală Pelikan Fount India cu 9 părți soluție salină.

Mus musculus



Șoarecele este considerat un organism model din următoarele motive:

- ☺ Ovogeneza și stadiile pre-implantaționale, sunt fundamental similare la șoarece și om. Desigur, scala de timp este diferită;
- ☺ Interesul medical și extrapolarea rezultatelor la om;
- ☺ Dezvoltare rapidă, independentă de sezon;
- ☺ Pot fi generați relativ ușor un număr mare de indivizi mutanți și transgenici;

Cu toate acestea, șoarecii nu sunt organisme ideale pentru studiile embrionare datorită următoarelor dezavantaje:

- ⊗ Embrionul se dezvoltă în interiorul corpului matern, fiind astfel greu de accesat;
- ⊗ Pentru manipulări experimentale sunt necesare operații, care în anumite țări necesită autorizație;
- ⊗ Embrionii sunt dificil de manipulat;
- ⊗ Este dificilă cultivarea perioade lungi de timp;
- ⊗ Doar embrionii timpurii pot fi recoltați prin spălarea oviductului. După implantare, embrionii nu mai pot fi îndepărtați din uter fără lezare;

În funcție de scopul experimentului se recoltează ovocite, ovule, embrioni pre-implantaționali sau post-implantaționali.

I. IZOLAREA OVOCITELOR IMATURE ȘI PRE-OVULATORII

Ovocitele imature din foliculii pre-antrali și cele pre-ovulatorii din foliculii antrali sunt cultivate pentru a fi fecundate *in vitro*. În mod normal, ovocitele sunt blocate în profaza meiozei I și trebuie să-și desăvârșească meioza înainte de a fi competente pentru fecundare. Ovocitele pre-ovulatorii izolate din foliculii antrali se maturează spontan în cultură. Ovocitele pre-antrale și cele la mijlocul fazei de creștere pot fi cultivate cu celulele foliculare înconjurătoare, 10-14 zile, înainte de a putea răspunde la FSH. În ambele cazuri, ovocitele odată fecundate și transferate la o femelă purtătoare pseudogestantă, suferă embriogeneza. Tehnicile de cultură sunt utile pentru studierea factorilor care influențează creșterea și diferențierea ovocitelor, natura interacțiilor ovocit-celule foliculare și efectul genotoxic al substanțelor chimice asupra ovocitelor în creștere. Maturarea spontană a ovocitelor din foliculii antrali poate fi blocată reversibil în cultură, prin adăugarea de dibutil AMPc și iso-butil-metil

xanthină (inhibitor fosfodiesterazic), ceea ce permite manipularea ovocitelor prin microinjectare, înaintea maturării finale și fecundării (Hogan și al., 1994).

Când șoarecii sunt menținuți într-un ciclu de lumină-întuneric, cu mijlocul perioadei de întuneric la miezul nopții, se recomandă începerea disecției între 11-12 a.m. Mai târziu, când celulele foliculare ale cumulusului oophorus se desprind, ovulele sunt mai dificil de aspirat.

Protocol experimental

1. Femela anesteziată în prealabil se sacrifică prin dislocare cervicală (ruperea gâtului). *Metoda este rapidă și cauzează suferință minimă.*
2. Se așează animalul pe spate, pe o hârtie absorbantă și se umezește cu etanol 70% sau 90%. *Această etapă este importantă și reduce riscul contaminării disecției cu păr de șoarece.*
3. Se realizează o incizie laterală, mică, pe linia mediană. Se rulează tegumentul deasupra și dedesubtul inciziei, până ce abdomenul este complet expus (Fig.37A).
4. Se secționează cavitatea corpului ca în figura 37B.
5. Se scot ansele tubului digestiv în afara corpului, pentru a evidenția cele două coarne uterine și ovarele (Fig.37C).
6. Se prinde capătul superior al unui corn uterin, cu pense fine și se trage ușor uterul, oviductul, ovarul și țesutul adipos în afara cavității corpului. Această operație va evidenția mezoteliul peritoneal vascularizat, care unește tractul reproducător de peretele corpului. Se perforează mezoteliul, în apropierea oviductului (Fig.38A)
7. Se întinde oviductul, ovarul și țesutul gras și se secționează între oviduct și ovar (Fig.38B). Se re poziționează pensa și se taie uterul, la capătul dinspre oviduct.
8. Se transferă oviductul și segmentul uterin într-un vas Petri de 35 mm sau în sticlă de ceas, cu mediu M2, la temperatura camerei. Se recoltează oviducte de la mai mulți șoareci în același vas.
9. Ovocitele proaspăt ovulate, înconjurate de cumulus oophorus, se găsesc în partea superioară a oviductului (ampula), care în acest moment (~12 ore după ovulație) este dilatată. Infundibulul oviductal este de asemenea dilatat în timpul ovulației și poate fi identificat ușor cu obiectivul 20X (Fig.38C).
10. Se transferă câte un oviduct în alt vas Petri, ce conține soluție de hialuronidază în mediu M2 (~300 mg/ml), la temperatura camerei și se observă la microscop, la mărire 20X sau 40X. Se folosește pensa pentru a prinde oviductul dilatat și a-l fixa ferm de fundul vasului. Cu altă pereche de pense se rupe oviductul, eliberând grupul de ovule.
11. Dacă ovulele nu sunt eliminate se folosește pensa, pentru a le împinge prin presarea ușoară a oviductului. Dacă ovulele se lipesc de suprafața oviductului se incubează câteva minute în soluția de hialuronidază. După acest tratament ovulele vor fi eliberate, deoarece digestia îndepărtează celulele lipicioase ale cumulusului oophorus. Dacă este necesar, se pipetează ovulele de câteva ori, însă după ce se desprind celulele cumulusului nu se lasă mai mult de câteva minute în soluția de hialuronidază. Dacă ovulele se lipesc de pense, se scoate pensa din vas. În acest mod ovulele vor fi reținute de tensiunea de suprafață și vor cădea la fundul vasului.
12. Se îndepărtează hialuronidaza prin spălare cu mediu M2, după care se transferă în mediu M16 pentru cultivarea la 37°C.

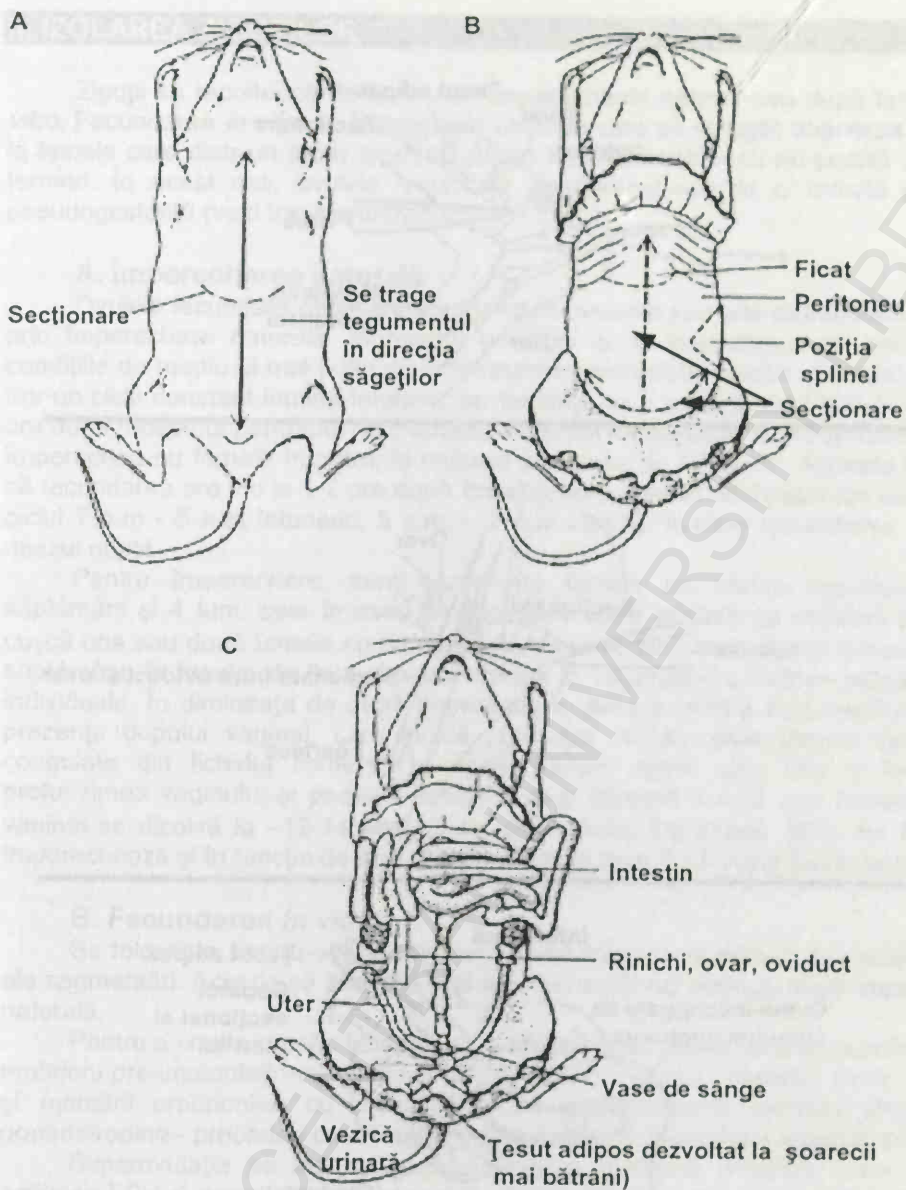
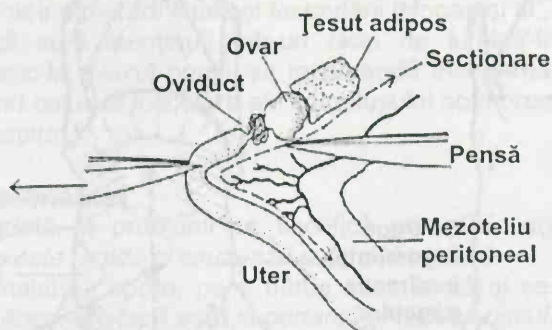
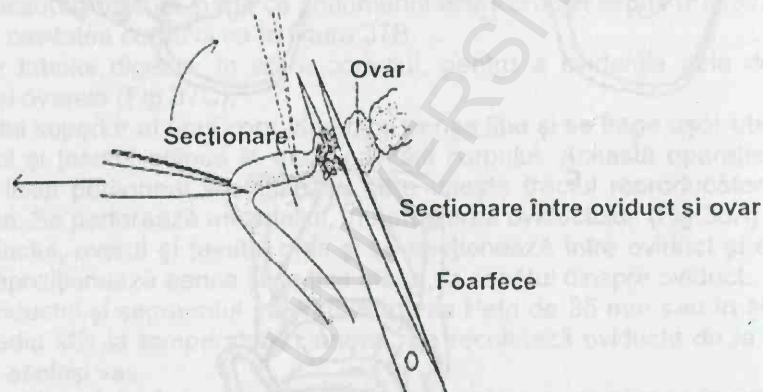


Fig.37. Schema disecției organelor reproducătoare la femela de șoarece. Inciziile sunt reprezentate de liniile punctate.

A



B



C

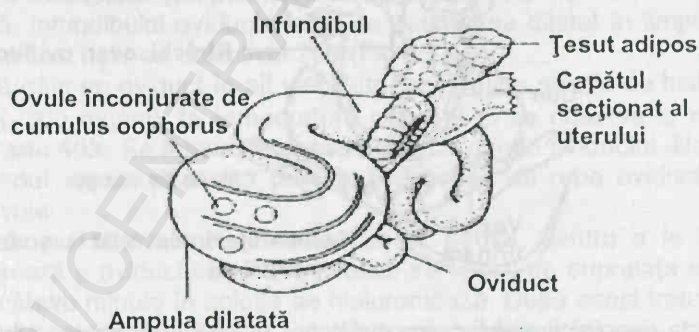


Fig.38. Schema recoltării ovulelor din oviduct.

II. IZOLAREA ZIGOȚILOR

Zigoții se recoltează de la female împerecheate natural sau după fecundare *in vitro*. Fecundarea *in vitro* se folosește în cazul în care se dorește obținerea de pui de la femele care dintr-un motiv sau altul nu se împerechează sau nu poartă gestația la termen. În acest caz, ovulele fecundate sunt transferate la o femelă purtătoare pseudogestantă (vezi transferul oviductal).

A. Împerecherea naturală

Ovulele fecundate necesare pentru microinjectare sau alte experimente se obțin prin împerechere naturală. Momentul ovulației și al fecundării sunt controlate de condițiile de mediu și mai puțin de administrarea gonadotropinelor. Femelele menținute într-un ciclu constant lumină-întuneric au tendința de a ovula o dată la 4-5 zile, la 3-5 ore după începutul perioadei de întuneric. Masculii menținuți în aceleași condiții se vor împerechea cu femele în estru, la mijlocul perioadei de întuneric. Aceasta înseamnă că fecundarea are loc la 1-2 ore după împerechere. Pentru microinjectări se folosește ciclul 7 p.m - 5 a.m întuneric, 5 a.m - 7 p.m lumină, în care fecundarea are loc la miezul nopții.

Pentru împerechere, sunt examinate femele cu vârste cuprinse între 6 săptămâni și 4 luni, cele în estru fiind plasate după amiaza cu masculi (în fiecare cușcă una sau două femele cu un mascul). Masculii ating maturitatea sexuală la ~6-8 săptămâni, în funcție de linie și odată folosiți în împerechere trebuie plasați în cuști individuale. În dimineața de după împerechere, fiecare femelă este verificată pentru prezența dopului vaginal, care indică copulația. Acesta este format din proteine coagulate din lichidul seminal. În unele cazuri, dopul este mic și localizat în profunzimea vaginului și poate fi observat doar folosind o lupă sau lanternă. Dopul vaginal se dizolvă la ~12-14 ore după împerechere. De obicei, 50% din femele se împerechează și în funcție de linie, fiecare conține între 7-13 ovule fecundate.

B. Fecundarea *in vitro*

Se folosește pentru obținerea unui număr mare de embrioni, în stadiile timpurii ale segmentării. Aceștia se dezvoltă mai sincron decât cei obținuți după împerecherea naturală.

Pentru a crește numărul de ovule, în experimente ce necesită un număr mare de embrioni pre-implanționali, de tipul microinjectării zigoților, infectării virale a morulei și marcării embrionilor cu radioizotopi, se administrează înaintea împerecherii, gonadotropine - procedeu cunoscut sub denumirea de **inducerea superovulației**.

Superovulația se induce cu ser de iapă gestantă (PMSG), care mimează acțiunea FSH și gonadotropină corionică umană (HCG¹²), care mimează acțiunea LH. Inducerea eficientă a superovulației la șoarece depinde de câteva aspecte: (1) vârsta și greutatea femelelor; (2) doza de gonadotropine; (3) momentul administrării gonadotropinelor; (4) linia de șoareci folosită.

Vârsta și greutatea

Maturitatea sexuală a femelei este un factor major ce afectează numărul de ovule superovulate. Vârsta optimă pentru superovulație variază de la linie la linie, însă de obicei este între 3-5 săptămâni, în timpul stadiului prepuberal al dezvoltării. De exemplu, vârsta optimă pentru femelele C57BL/6J este de 25 de zile iar cea pentru

¹²Human Chorionic Gonadotropin

linia BALB/cGa este de 21 de zile. În acest moment al dezvoltării, crește numărul de foliculi capabili de a răspunde la FSH. FSH este ingredientul activ din serul de iapă gestantă.

Cu toate acestea, vârsta nu este un indicator sigur al maturității sexuale a femelelor. Starea nutrițională și de sănătate poate afecta maturarea foliculară. Animalele subponderale și/sau bolnave au tendința de a fi întârziate în dezvoltare și furnizează un număr redus de ovule după superovulație. De exemplu, în linia C57BL/6J, numărul maxim de ovule viabile fecundate este obținut numai de la femele superovulate, care au o vârstă de 25 de zile și o greutate cuprinsă între 12,5-14 grame.

Doza de gonadotropină

Pentru majoritatea liniilor de șoarece se recomandă injectarea intraperitoneală a unei doze de 5 U.I ser de iapă gestantă. Serul de iapă gestantă este comercializat sub formă de pudră. Pentru administrare, este resuspendat în 0,9% NaCl steril, la o concentrație de 50 U.I/ml și apoi porționat. Poate fi stocat la -20°C , în această formă, cel puțin o lună. Se injectează în fiecare animal o doză de 0,1 ml.

Gonadotropina corionică umană necesară pentru inducerea ovulației se administrează intraperitoneal, la o concentrație de 5 U.I, deși o doză de 2,5 U.I poate fi suficientă pentru a induce ovulația la majoritatea liniilor. Comercializată tot sub formă de pudră, se resuspendă 500 U.I/ml în apă sterilă, se porționează în doze de 100 μl , se liofilizează și se stochează la -20°C , ferită de lumină. În momentul administrării se resuspendă un volum de 100 μl într-un ml 0,9% NaCl (concentrația finală de 50 U.I/ml) și se injectează 0,1 ml în fiecare animal.

Momentul administrării gonadotropinelor

Momentul în care se administrează serul de iapă gestantă și gonadotropina corionică umană va afecta uniformitatea dezvoltării și numărul de ovule recoltate de la femele superovulate. Pentru majoritatea liniilor, intervalul optim între injectarea serului de iapă gestantă și gonadotropina corionică umană este de 42-48 de ore. În general, ovulația are loc la 10-13 ore după injectarea gonadotropinei corionice umane, însă pentru a controla momentul ovulației este importantă administrarea HCG înaintea eliberării LH endogen. Momentul în care este eliberat LH endogen, ca răspuns la serul de iapă gestantă este reglat de ciclul lumină-întuneric. Pentru majoritatea liniilor, momentul eliberării LH endogen este între 15-20 de ore după miezul nopții celei de-a doua perioade de întuneric, după injectarea serului de iapă gestantă. De exemplu, pe ciclul de lumină de la 5 a.m. la 7 p.m, serul de iapă gestantă este administrat între 1 - 2 p.m, gonadotropina corionică umană este injectată după 46-48 ore, de obicei între ora 12 a.m - 1 p.m și la cel puțin 2-3 ore înaintea eliberării LH endogen. După administrarea gonadotropinei corionice, fiecare femelă se plasează într-o cușcă cu un mascul. Se verifică în dimineața următoare prezența dopului vaginal.

Linia de șoareci folosită

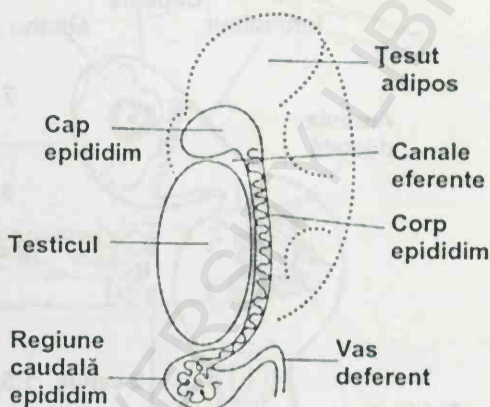
Liniile de șoarece se împart în două categorii: intens ovulatorii, care ovulează între 40-60 ovule/șoarece și slab ovulatorii, care produc 15 sau mai puține ovule/șoarece. O femelă de șoarece nestimulată hormonal eliberează 6-13 ovule.

Protocol experimental

1. Se injectează femele cu ser de iapă gestantă și gonadotropină corionică umană în dozele precizate mai sus.
2. Se sacrifică masculii, la 12 ore de la injectarea femelelor cu gonadotropină. Se disecă epididimul (Fig.39), îndepărtând cât mai mult din țesutul gras. Se secționează vasele deferente în apropierea epididimului caudal și se plasează într-

o picătură de 500 μ l mediu Whittingham cu 30 mg/ml BSA. Picătura este acoperită cu ulei de parafină ușor¹³. Se presează ușor vasele deferente cu o pensă, pentru eliberarea spermatozoizilor. Este esențial ca spermatozoizii să fie incubati apoi o oră jumătate, la 37°C, în prezență de 2% albumină serică bovină delipidizată, pentru inducerea capacitării.

Fig.39. Testicul și epididim disecat din masculul matur de șoarece.



3. Se sacrifică femela de șoarece la 12 ore jumătate - 14 ore de la injecția de gonadotropină corionică umană și se disecă oviductul ca în figura 38. Momentul precis variază între linii și este determinat empiric. *Inseminarea înainte de 13 ore jumătate de la administrarea gonadotropinei corionice nu conduce la fecundare.*
4. Se pregătește cultura în picătură (vezi cultura embrionilor, secțiunea V).
5. Cu pipete de transfer sterile, se plasează până la 10 ovule în fiecare picătură de 1000 μ l, cu mediu Whittingham, suplimentat cu 30 mg/ml BSA, sub ulei de parafină ușor. Se incubează la 37°C.
6. Între 13 ore jumătate - 15 ore de la administrarea HCG, se realizează inseminarea, prin adăugarea a 100 μ l suspensie de spermatozoizi la fiecare picătură cu ovule, astfel încât concentrația spermatozoizilor să fie de 1×10^6 - 2×10^6 spermatozoizi/ml. Se incubează ovulele și spermatozoizii, 4 ore, la 37°C.
7. Cu pipete sterile se transferă zigoții în mediu steril M16, cu 4 mg/ml BSA, astfel încât să se aspire cât mai puțini spermatozoizi. Fecundarea este indicată de prezența celui de-al doilea globul polar, la 3-6 ore după inseminare.

III. IZOLAREA EMBRIONILOR PRE-IMPLANTAȚIONALI

Embrionii pre-implantaționali se recoltează prin spălarea oviductelor cu mediu de cultură. În figura 40 sunt prezentate stadiile pre-implantaționale, localizarea lor de-a lungul oviductului și intervalul de timp când pot fi recoltate.

Embrionii de 2-8 blastomere sunt prezenți în oviduct la 20-60 de ore de la împerechere. În acest moment, embrionii au pierdut cumulus oophorus și pot fi scoși din oviduct folosind o cantitate mică de mediu M2.

¹³Ulei mineral cu o densitate de 0,84 g/ml.

Etapile de lucru sunt asemănătoare cu protocolul de izolare a ovulelor (secțiunea I), însă nu se folosește hialuronidaza.

Blastociștii pot fi spălați din uter între 3 zile jumătate – patru zile jumătate de la împerechere.

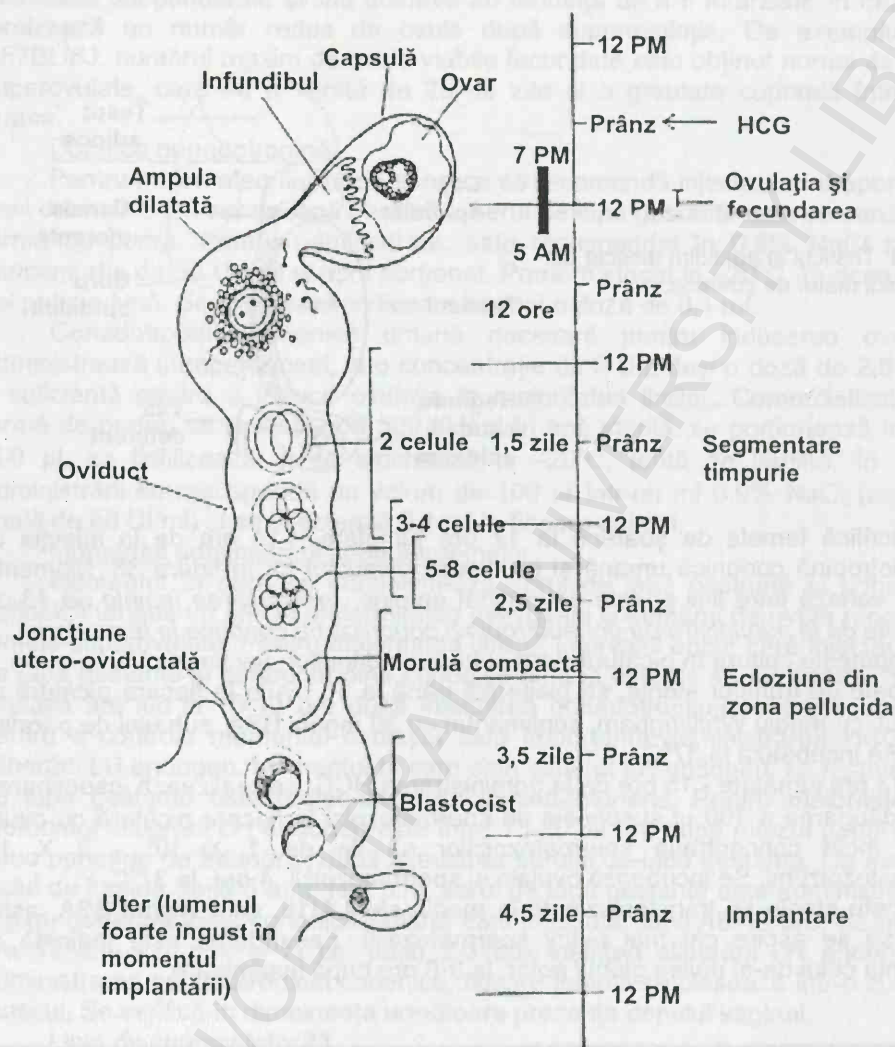


Fig.40. Schema dezvoltării pre-implantaționale la șoarece.

Protocol experimental

1. Se deschide cavitatea abdominală ca în protocolul experimental din secțiunea I.
2. Pentru îndepărtarea uterului se fixează pensa deasupra cervixului (Fig.41A) și se secționează transversal (Fig.41B).
3. Se secționează deasupra joncțiunii cu oviductul și se disociază uterul de mezoteliul peritoneal (Fig.41C).

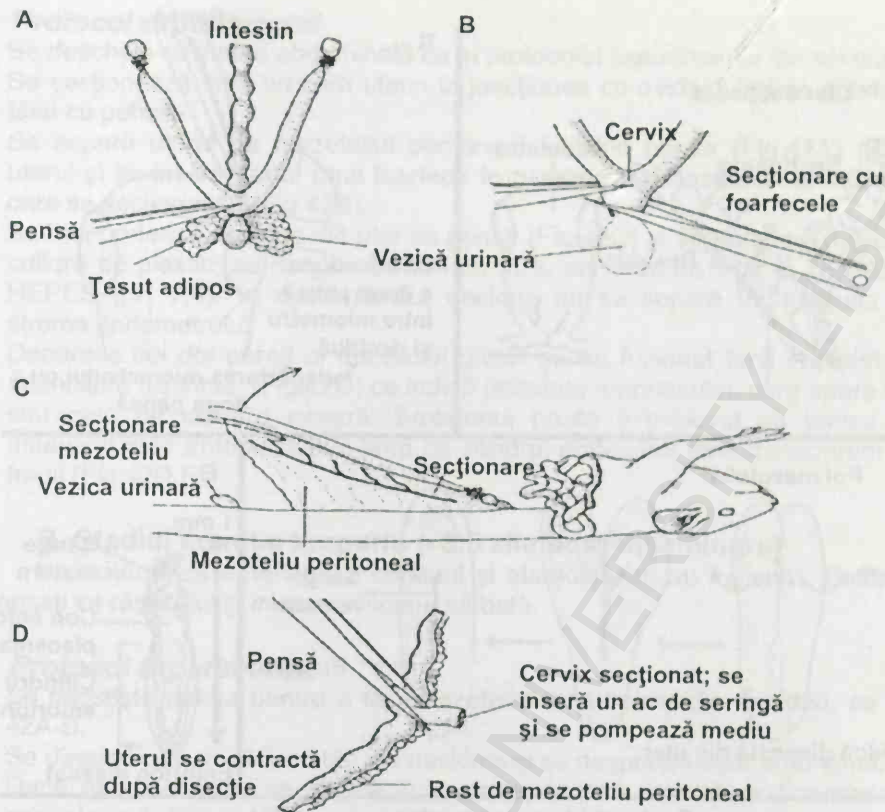


Fig.41. Disecția uterului pentru recoltarea blastociștilor.

4. Prelevarea blastociștilor este foarte dificilă dacă au ieșit din zona pellucida și s-au atașat de uter.
5. Se plasează uterul într-un volum mic de mediu M2 în vas de cultură de plastic de 35 mm și se spală fiecare corn uterin cu ~0,2 ml de mediu M2, cu o seringă de 1-2 ml și ac hipodermic mărimea 25 (Fig.41D).

IV. IZOLAREA EMBRIONILOR POST-IMPLANTAȚIONALI

Pentru a rămâne viabili în timpul disecției, embrionii post-implantaționali necesită medii de cultură mai complexe decât cei pre-implantaționali. De obicei, disecția embrionilor se face în mediul de cultură DMEM¹⁴ cu 10% ser fetal de vițel. Rolul serului fetal este de a împiedica țesutul să devină prea lipicios. Serul poate fi înlocuit cu albumină serică bovină. Se adaugă tampon HEPES (~25 mM, pH 7,4) pentru a menține un pH optim în cursul manipulării în afara incubatorului.

¹⁴Dulbecco Modified Eagle Medium

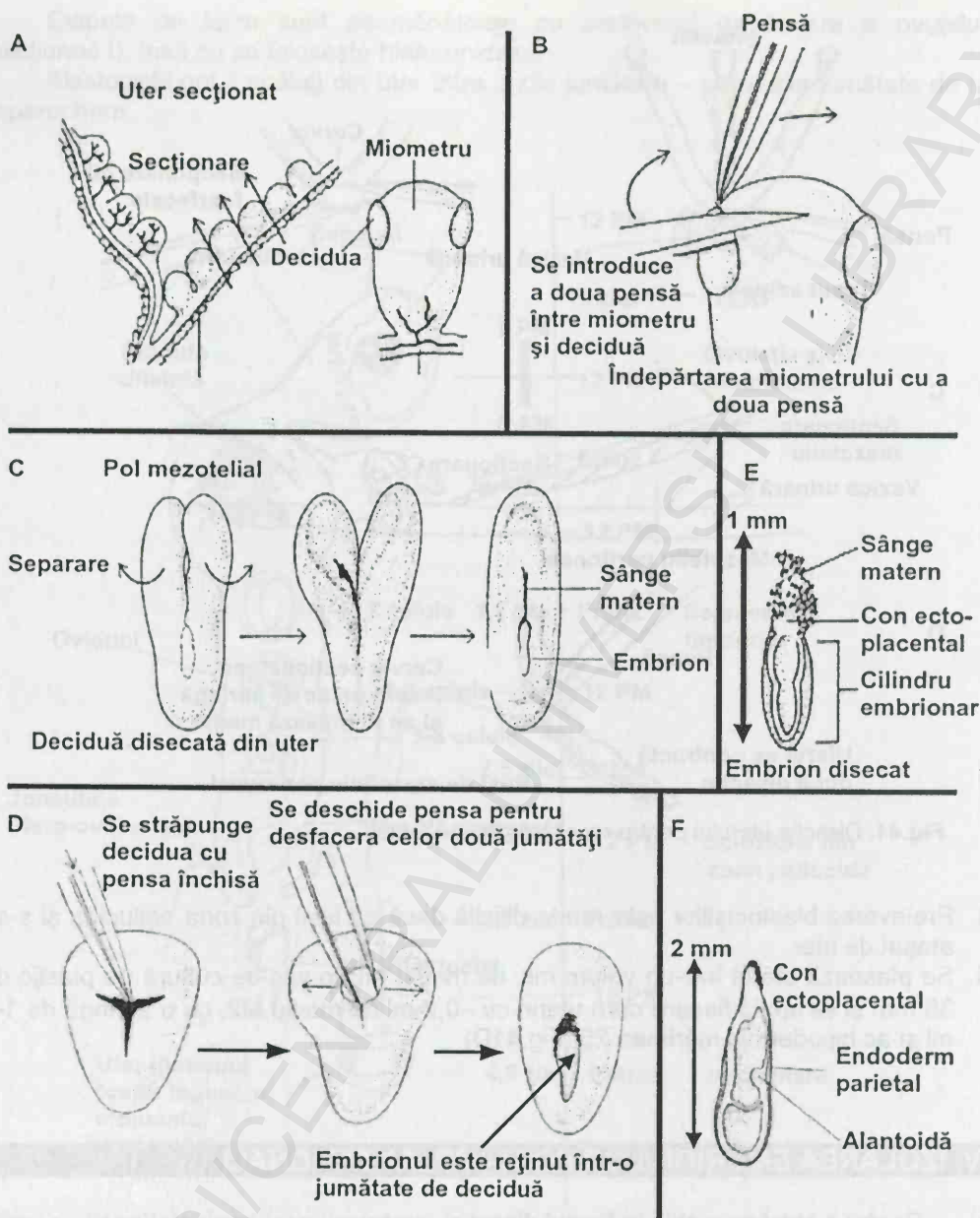


Fig.42. A-D-Disecția embrionilor de șoarece de 6 zile jumătate - 8 zile post-împerechere. E-Embrion de 6 zile jumătate. F-Embrion de 7 zile jumătate

A. Stadiul de neurulă timpurie

Acest protocol se poate folosi pentru izolarea embrionilor din stadiul de linie primitivă incipientă (6 zile jumătate post-inseminare) și până în stadiul de neurulă timpurie (8 zile post-inseminare).

Protocol experimental

1. Se deschide cavitatea abdominală ca în protocolul experimental din secțiunea I.
2. Se secționează câte un corn uterin la joncțiunea cu oviductul și se prinde capătul tăiat cu pensa.
3. Se separă uterul de mezoteliul peritoneal folosind pensa (Fig.42A). Se întinde uterul și se inseră vârful unui foarfece în peretele antimezotelial al uterului, după care se secționează (Fig.42B).
4. Se îndepărtează decidua din uter cu pensa (Fig.42C) și se transferă într-un vas de cultură de plastic, ce conține DMEM cu 10% ser fetal de vițel și 25 mM tampon HEPES (pH 7,4). În acest stadiu, decidua nu se separă întotdeauna ușor de stroma endometrului.
5. Deoarece cei doi pereți ai epiteliului uterin nu au fuzionat încă complet există o adâncitură distinctă (Fig.42D) ce indică prezența embrionului, care apare ca o linie sau pată de culoare neagră. Embrionul poate fi prelevat cu pensa. Tesutul întunecat este trofoblastul, în timp ce cilindrul embrionar este transparent și foarte fragil (Fig.42D,F).

B. Stadiul somitic timpuriu (~8,5 zile post-inseminare)

La majoritatea embrionilor, corionul și alantoida nu au fuzionat. Embrionii mai avansați se răsucesc și inima va începe să bată.

Protocol experimental

1. Se folosește pensa pentru a tăia mezoteliul la o treime din deciduă, ca în figura 42A-B.
2. Se despart cele două jumătăți ale deciduei și se desprinde ușor embrionul.
3. Dacă este necesar, se disecă și se îndepărtează anexele extraembrionare cu pensele ca în figura 43C.

C. Izolarea anexelor extraembrionare

Cea mai bună sursă de trofoblast este conul ectoplacental de 7 zile jumătate-8 zile jumătate (Fig.42F). Pentru izolarea simultană a sacului vitelin parietal, sacului vitelin visceral și amniosului, se folosesc embrioni de 13 zile jumătate. Sacul vitelin parietal începe să degenereze în embrionii mai avansați și dispare în zilele 15-16. Datorită secreției abundente de glicozaminoglicani, amniosul devine foarte lipicios și dificil de manevrat spre sfârșitul gestației. Acest neajuns poate fi evitat prin incubarea scurt timp în soluție de hialuronidază în DMEM (~300 mg/ml).

Protocol experimental

1. Se izolează prin procedeele descrise mai sus uterul plin cu embrioni (Fig.44).
2. Se îndepărtează stratul muscular al uterului (care în unele cazuri se retractă spontan) (Fig.45A).
3. Se rotește embrionul cu vârfurile a două perechi de pense și se taie în jurul joncțiunii membranei Reichert cu placenta (Fig.45B). Membrana Reichert cu endodermul parietal atașat poate fi îndepărtată și transferată în mediu proaspăt fără ser. Unele celule trofoblastice vor rămâne atașate. *Numărul de celule trofoblastice va depinde de vârsta și linia de șoareci (șoarecii C3H/He au puține celule trofoblastice la 13 zile jumătate post-inseminare). La 15 zile, membrana Reichert va fi foarte subțire și majoritatea celulelor endodermale parietale vor degenera.*

4. Pentru observarea endodermului parietal *in situ*, membrana Reichert poate fi atașată de suprafața unui vas de cultură de plastic. Se străpunge în jurul periferiei fiecărei membrane cu o pensă închisă, ancorând astfel membrana pe fundul vasului de plastic. Se spală membranele Reichert ușor, în mediu fără ser și dacă este necesar pentru imunohistochimie se fixează în amestec metanol: acetona (1:1), 5 minute, la temperatura camerei, se usucă și se stochează la -70°C .

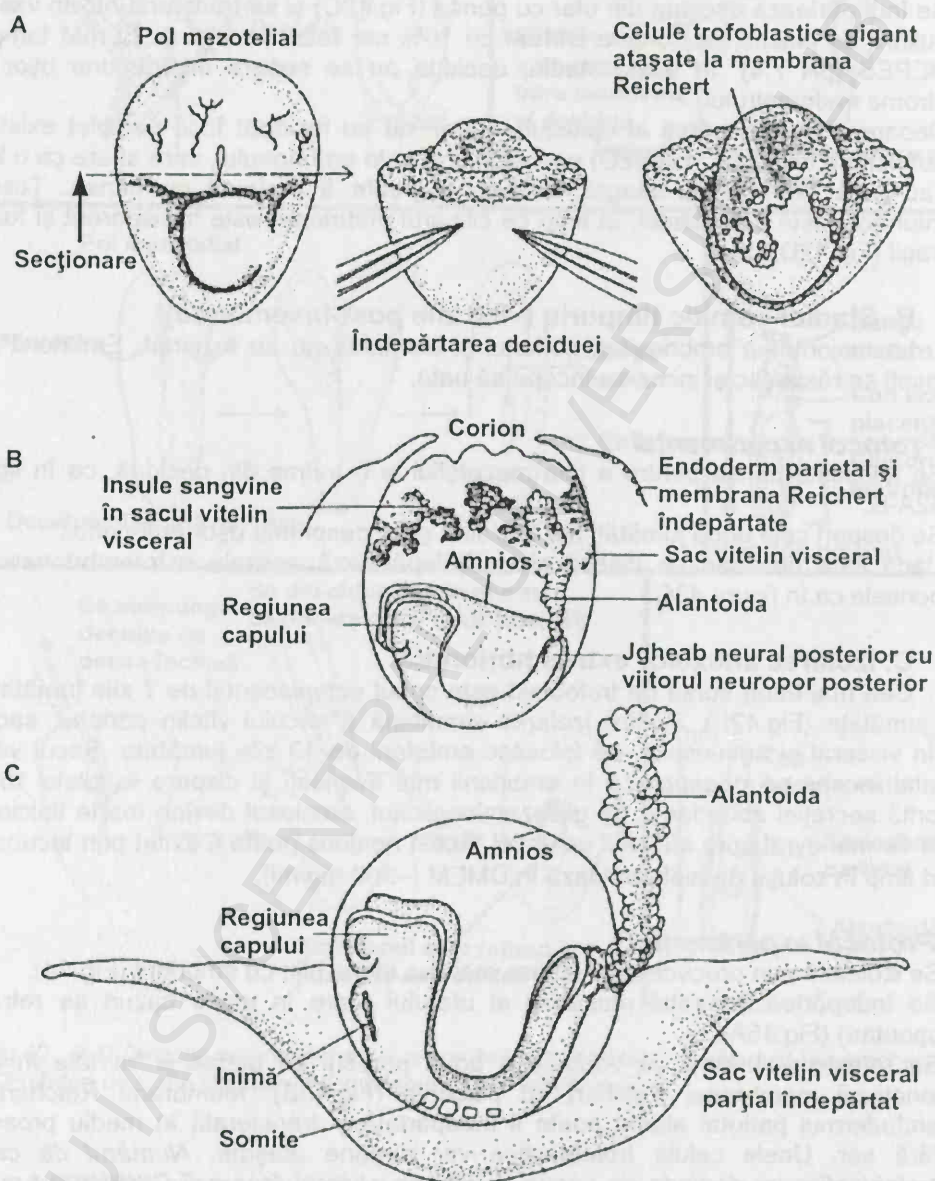


Fig.43. Disecția embrionilor de șoarece la 8 zile jumătate post-împerechere.

5. După îndepărtarea endodermului parietal se folosește un foarfece fin pentru a tăia placenta și partea superioară a sacului vitelin visceral. Acum sacul vitelin visceral poate fi separat de embrion (înconjurat de amnios). Amniosul este foarte fragil și poate fi rupt în timpul disecției (Fig.45C).

Fig.44. Uter de șoarece plin cu embrioni.

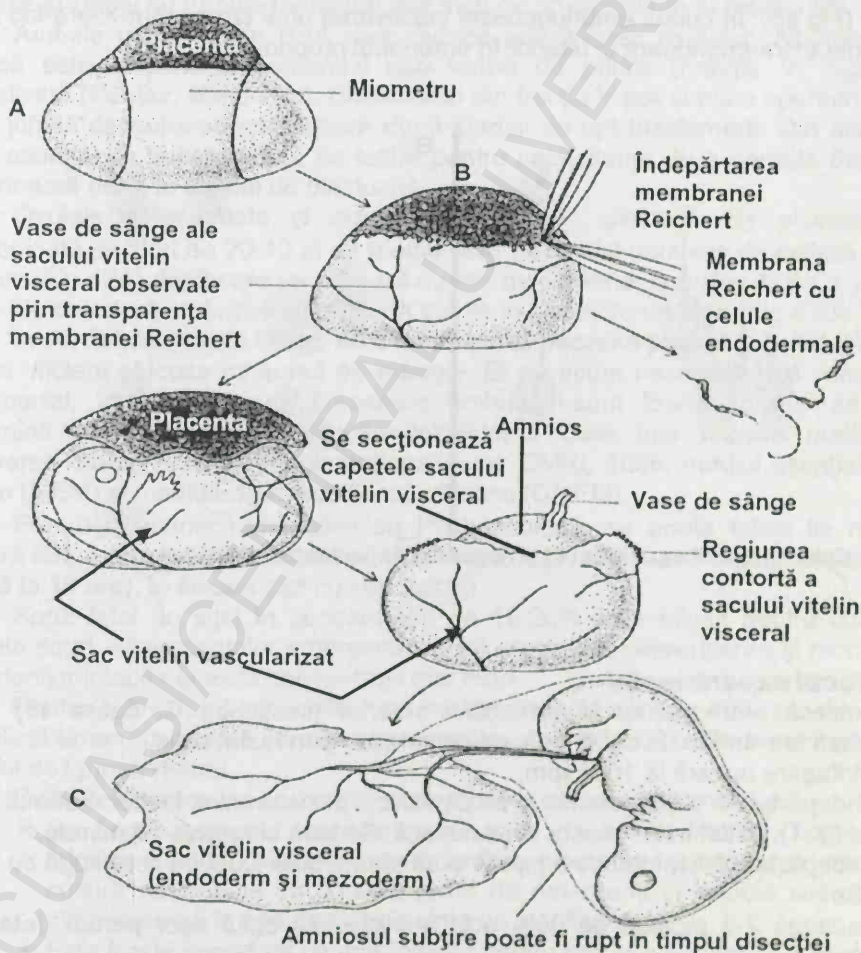
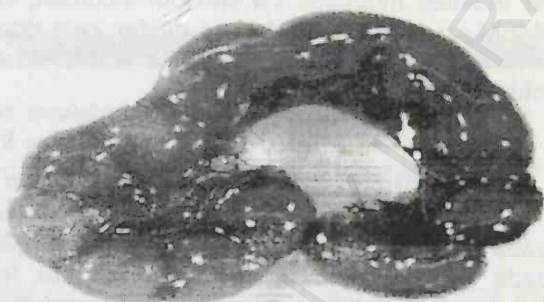


Fig.45. Schema disecției embrionului de șoarece la 13 jumătate zile post-împerechere.

6. Stratul epitelial al endodermului visceral (de la embrioni de 9 zile jumătate-13 zile jumătate) poate fi separat de mezodermul adiacent (celule endoteliale, insule sangvine, fibroblaste) prin incubarea într-o soluție enzimatică ce conține pancreatină-tripsină, 15 minute – o oră jumătate, la 4°C. Timpul va fi determinat empiric pentru fiecare lot de enzime. Se spală sacul vitelin visceral cu mediu fără ser înainte de incubare. La sfârșitul incubării, se transferă sacul vitelin visceral în DMEM cu 10% ser fetal și se desfac cele două straturi ale țesutului, cu pensele. Straturile separate pot fi dissociate ulterior în celule individuale prin incubarea în soluție tripsină/EDTA.

D. Sexarea embrionilor prin colorarea nucleilor celulelor amniotice

Metoda este folosită pentru identificarea sexului embrionilor timpurii, în perioada în care creasta genitală este bipotențială, însă poate fi realizată pe toată perioada gestației. Nucleii embrionilor de sex femel conțin cromatina sexuală sau corpusculul Barr, care reprezintă heterocromatina cromozomului X inactiv. Aceasta este o structură intens colorată, situată în majoritatea cazurilor la periferia membranei nucleare (Fig.46). În cursul embriogenezei inactivarea unui cromozom X are loc inițial în țesuturile extraembrionare și ulterior în embrionul propriu-zis.

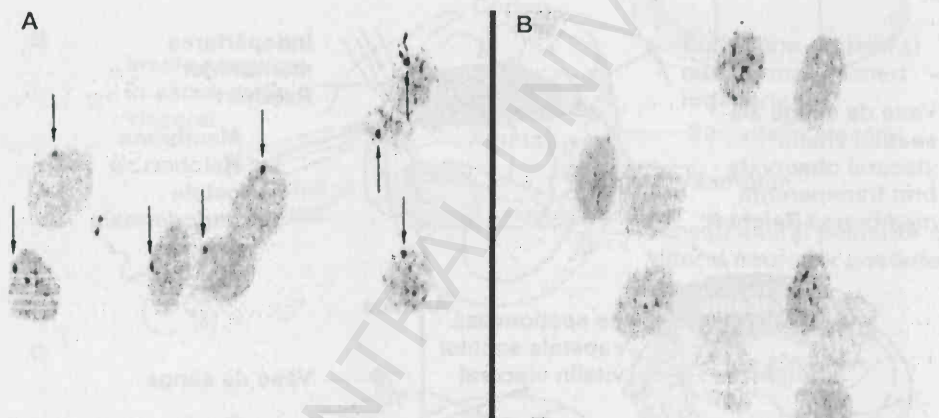


Fig.46. Celule amniotice pozitive (A) și negative (B) pentru cromatina sexuală.

Protocol experimental

1. Se disecă amniosul ca în protocolul anterior (secțiunea C, figura 45) și se plasează într-un tub de centrifugă, ce conține tampon fosfat salin.
2. Centrifugare ușoară la 1000 rpm.
3. Se îndepărtează supernatantul și se pipetează peste amnios fixator metanol : acid acetic (3 : 1), astfel încât acesta să plutească. Se lasă în repaus 10 minute.
4. Se îndepărtează fixatorul cu o pipetă și se șterge bine tubul de centrifugă cu hârtie de filtru.
5. Se adaugă 2-3 picături de 60% acid acetic și se agită ușor pentru detașarea celulelor.
6. Blocarea acțiunii acidului acetic prin adăugarea de 1 ml fixator.

7. Centrifugare la 5000 rpm, 1 minut. Se îndepărtează supernatantul.
8. Se diluează sedimentul celular cu o picătură de supernatant.
9. Pipetarea suspensiei celulare pe o lamă de sticlă curată și uscare.
10. Se adaugă o picătură de 1% soluție de albastru de toluidină apoasă și se vizionează la microscop.

V. CULTIVAREA EMBRIONILOR

Pentru manipularea *in vitro* a ovulelor și embrionilor pre-implantaționali sunt necesare două medii de cultură, M16 și M2.

Mediul M16 este folosit pentru cultura în picătură, într-un incubator, la 37°C și 5% CO₂. Acest mediu este tamponat doar cu bicarbonat și în consecință necorespunzător pentru menținerea în afara incubatorului, deoarece embrionii sunt foarte sensibili la modificările de pH.

Mediu M2 este în esență similar cu mediul M16, însă bicarbonatul este înlocuit parțial cu tampon HEPES, pentru a facilita supraviețuirea în afara incubatorului. Ovulele și zigoții nu trebuie menținuți mai mult de 30 de minute în mediul M2.

Ambele medii conțin BSA care reduce adezivitatea ovulelor. Albumina serică bovină este disponibilă comercial sub formă de pudră (Frația V, Sigma) sau cristalizată (Pentex, Miles Lab). Unele loturi din fracția V pot conține spermin oxidază, care inhibă dezvoltarea embrionară după stadiul de opt blastomere. Din acest motiv este esențial ca fiecare lot să fie testat pentru capacitatea de a permite dezvoltarea embrionară până în stadiul de blastocist.

Ovulele nefecundate și zigoții se cultivă în picătură. Se plasează cu o micropipetă picături de 20-40 μl de mediu M16 pe fundul unui vas de cultură steril, de 35 mm (Fig.47A) după care se acoperă cu ulei de parafină ușor (Fig.47B-C).

Se transferă embrionii cu o pipetă sterilă în picăturile de M16 (Fig.47D).

În stadiul de morulă târzie, embrionii nu mai necesită piruvat și lactat, însă ei pot utiliza eficient glucoza ca sursă de energie. Ei au acum necesități mai complexe de aminoacizi, vitamine și ser. Deoarece embrionii sunt foarte lipicioși se adaugă albumină serică bovină sau polivinilpirolidonă. Cele mai folosite medii pentru cultivarea embrionilor post-implantaționali sunt: CMRL 1066, mediul esențial minimal Eagle (MEM) și mediu Eagle modificat Dulbecco (DMEM).

Pentru marcările radioactive cu [³⁵S]metionină, se poate folosi fie mediu de cultură fără metionină (în incubări până la o oră) sau mediu cu 1 mg/ml metionină rece (până la 16 ore), în fiecare caz cu ser dializat.

Serul fetal de vițel în concentrație de 10-20% este folosit pentru culturile pe termen scurt a fragmentelor embrionare, însă creșterea, diferențierea și morfogeneza embrionilor intacti necesită concentrații mai mari.

Pentru cultivarea blastocisților cel mai bun mediu conține 40% ser din cordonul ombilical uman. În aceste condiții supraviețuiesc până la 60% din blastocisți până în stadiul de jgheab neural.

Culturile embrionare necesită respectarea următoarelor condiții:

- ☞ Se folosesc pipete, containere și vase de plastic sterile. Toată sticlăria folosită pentru colectarea embrionilor, pipetarea și stocarea mediilor de cultură nu trebuie să conțină urme de detergenți și trebuie spălată de cel puțin șase ori în apă distilată înainte de sterilizare;
- ☞ Este foarte important ca apa folosită pentru prepararea mediului de cultură să fie bidistilată sau purificată prin filtrare (MilliQ) și stocată în containere curate,

de plastic. Apa purificată prin filtrare trebuie testată pentru endotoxine. Nu se recomandă stocarea prelungită. Dacă este necesar, se adaugă 100 mM EDTA la mediul de cultură pentru a evita contaminarea cu metale grele;

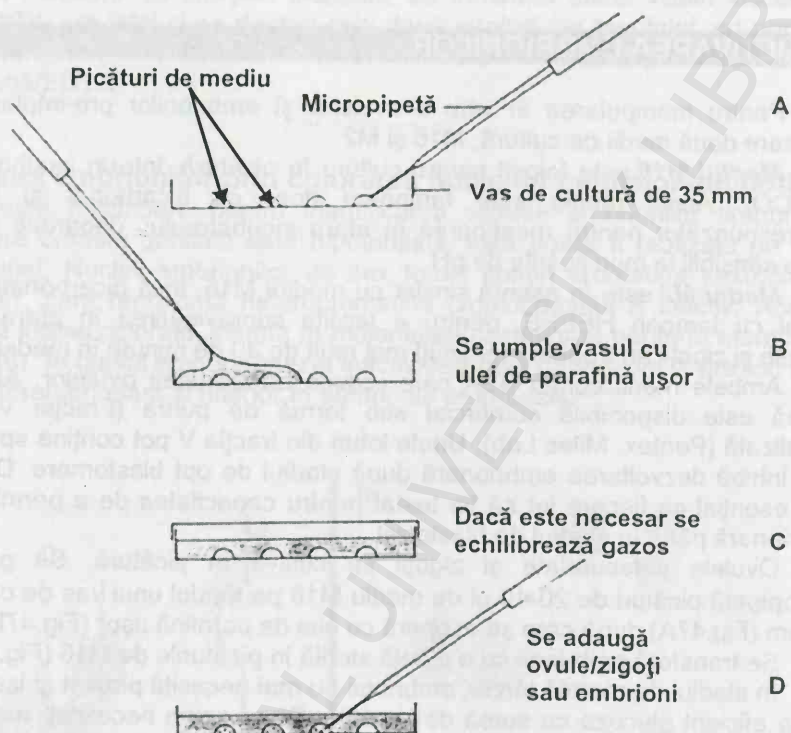


Fig.47. Etapele pregătirii culturii în picătură. A-Se plasează cu o micropipetă picături mici de mediu M16 într-un vas de cultură steril de 35 mm. B-C-Vasul este acoperit cu ulei de parafină ușor și plasat la 37°C. D-Se transferă embrionii în picături.

- ↳ Se folosesc doar substanțe chimice cu cel mai înalt grad de puritate;
- ↳ Nu se stochează mediul de cultură embrionar mai mult de 1-2 săptămâni. Mediile de cultură au o durată de viață limitată chiar la 4°C, în special dacă conțin glutamină (oxidată la acid glutamic) și ser (conține glutaminază). Dacă este necesar, se completează glutamina înaintea folosirii, la o concentrație finală de 1-2 mM;
- ↳ Se porționează serul în recipiente sterile mici și se stochează la -20°C. Dacă este necesar (pentru distrugerea complementului) se inactivează serul prin încălzire la 56°C, pe baie de apă, 30 minute. Această etapă este necesară doar în cazul în care serul conține anticorpi față de embrioni sau celule din teratocarcinoame;
- ↳ Majoritatea incubărilor au loc într-o atmosferă umedă, cu 5% CO₂, 95% aer, reglat automat. Unele laboratoare preferă o atmosferă ce conține 5% CO₂, 5% O₂ și 90% N₂, combinație care crește supraviețuirea embrionilor în stadiile timpurii ale segmentării;

- ☞ Ovulele și embrionii cu două blastomere nu tolerează fluctuațiile de pH și temperatură. Pentru unele experimente (fecundare *in vitro* sau manipulare prelungită a blastomerelor disociate) este recomandabilă încălzirea la 37°C a platinei microscopului;
- ☞ Celulele se vor atașa eficient pe suprafața de plastic a vasului de cultură;
- ☞ Soluțiile ce conțin proteine pot fi sterilizate prin filtre Millipore (tip GS, dimensiunea porilor 0,22 mm);
- ☞ Mediile pentru colectarea ovulelor și blastocistilor conțin antibiotice și trebuie sterilizate prin filtrare înainte de folosire. Dacă embrionii sunt returnați în oviduct sau uter, după o perioadă scurtă de incubare, nu sunt necesare precauții suplimentare pentru contaminare. Dacă embrionii sunt incubați mai mult de 24 de ore, sunt necesare tehnici sterile pentru a evita contaminarea cu bacterii sau drojdii. În acest caz, se așează stereomicroscopul înăuntrul unei hote cu flux laminar, unde se realizează toate operațiile.
- ☞ Embrionii între 6 zile jumătate – 11 zile jumătate pot fi cultivați în tuburi sau flacoane așezate pe platforme rotative. Principalele aspecte ale culturii embrionilor întregi sunt: (1) serul de șobolan este componentul major al mediului; (2) culturile sunt realizate în volume mici de mediu, în tuburi rotite continuu pe role sau suporturi rotative, asigurându-se astfel un echilibru constant între mediu și faza gazoasă; (3) compoziția gazoasă este variată în funcție de stadiul de dezvoltare. În aceste condiții embrionii se dezvoltă normal, doar cu o ușoară întârziere în creștere, de 48 de ore.

Protocol experimental

Protocolul experimental este același pentru embrionii în orice stadiu. Embrionii sunt izolați din uter cum s-a descris mai sus. Toate manipulările se realizează în mediu cu 10% ser fetal de vițel. Un mediu corespunzător pentru stocarea pe termen scurt a embrionilor este DMEM cu 10% ser fetal de vițel și HEPES (25 mM, pH 7,4). Membrana Reichert nu se dezvoltă bine *in vitro* și trebuie îndepărtată înaintea plasării embrionilor în cultură. Îndepărtarea membranei Reichert din embrionii în stadiul de linia primitivă târzie este ilustrată în secțiunea C (Fig.45).

1. Se fixează embrionul pe fundul unui vas de plastic bacteriologic, prin inserarea vârfurilor unei pense în cavitatea vitelină, în regiunea conului ectoplacental.
2. Se inseră vârfurile celei de-a doua perechi de pense la același nivel și se rupe membrana Reichert, care se va retrace către conul ectoplacental.
3. Se îndepărtează membrana Reichert cu o pensă. Embrionii pot fi alterați în acest proces, prin înțeparea endodermului. Embrionii afectați sunt îndepărtați.
4. Cu o pipetă Pasteur se transferă embrionii în tuburi Falcon (Fig.48). Embrionii mai mari de 8 zile jumătate trebuie transferați inițial în mediu de cultură, înaintea plasării pe platformele rotative. Acest procedeu împiedică folosirea unui volum excesiv de DMEM tamponat cu HEPES (HEPES interferează cu tamponarea mediului cu CO₂).

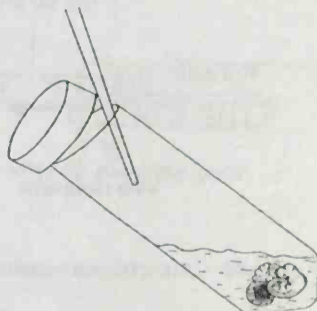


Fig.48. Pentru cultură embrionul se transferă într-un tub Falcon cu mediu de cultură.

După manipularea experimentală zigojii sau embrionii pre-implantaționali trebuie transferați la femele purtătoare pseudogestante pentru continuarea dezvoltării embrionare. Această strategie experimentală implică două etape: (1) obținerea de femele pseudogestante; (2) transferul oviductal sau uterin.

VI. VASECTOMIZAREA MASCULILOR ȘI PREGĂTIREA FEMELELOR PSEUDOGESTANTE

Masculii vasectomizați sunt necesari pentru a produce femele pseudogestante. După împerecherea cu masculi sterili, tractul reproducător al femelelor devine receptiv pentru embrionii transferați, chiar dacă propriile ovule nefecundate degenerază. O femelă pseudogestantă nu va reîncepe ciclul natural ~11 zile. Pentru transferul oviductal, se folosesc femele pseudogestante de 12 ore (împerecheate cu o noapte înainte), în timp ce pentru cel uterin se folosesc femele la 2 zile jumătate (sau 3 zile jumătate) de pseudogestație.

Protocol experimental

1. Se anesteziază masculii prin injectare intraperitoneală cu 0,015-0,017 ml de 2,5% avertin/gram de greutate corporală. Se pot folosi masculi de cel puțin două luni.
2. Se rade abdomenul și se șterge cu etanol 70%.
3. Se deschide cavitatea corpului printr-o incizie transversală de 1,5 cm în tegument și musculatură (vezi figura 37).
4. Cu un ac chirurgical curbat se prinde o bucată de catgut în peretele corpului (acesta va indica mai târziu peretele corpului).
5. Se scot ambele testicule prin incizie.
6. Vasul deferent este așezat sub testicul și poate fi recunoscut prin prezența unui vas de sânge. Se prinde vasul deferent cu o pensă, astfel încât să formeze o buclă. Se înroșește la flacără o altă pensă și se cauterizează vasul deferent ca în figura 49. Se separă capetele cauterizate.

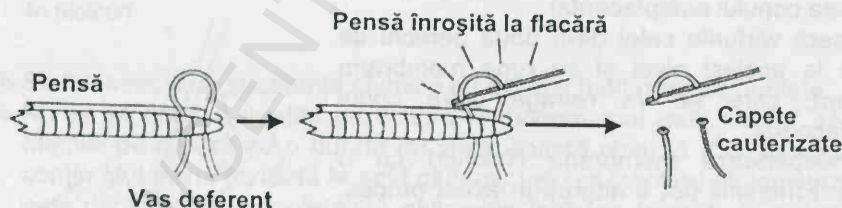


Fig.49. Cauterizarea vaselor deferente.

7. Se prinde țesutul gras cu pensă și se plasează cu grijă testiculul înapoi în abdomen. Se repetă etapa anterioară și cu testiculul drept.
8. Se suturează peretele corpului și tegumentul. Masculii operați se pot împerechea după ~10 zile.

VII. TRANSFERUL ZIGOȚILOR ȘI EMBRIONILOR

Zigoții și embrionii până în stadiul de blastocist (12 ore - 3 zile jumătate post-împerechere) pot fi transferați în tractul reproducător al unei femele pseudogestante pentru continuarea dezvoltării. Zigoții și embrionii până în stadiul de morulă (12 ore - 2 zile jumătate post-împerechere) sunt transferați în oviductul femelelor (regiunea ampulei) la 12 ore de pseudogestație, în timp ce blastociștii de 3 zile jumătate sunt transferați în coarnele uterine la femele aflate în a doua zi jumătate de pseudogestație. Prima procedură se numește transfer oviductal și poate fi realizată doar cu embrioni ce conțin zona pellucida. A doua procedură se referă la transferul uterin. Pentru transferul uterin, embrionii pot să fie lipsiți de zona pellucida. În general, pentru ambele proceduri, 50-75% din embrioni se dezvoltă la termen. Pentru a obține 5-7 pui se transferă un număr suficient de embrioni.

Protocol experimental

1. Se anesteziază femela prin injectare intraperitoneală cu 0,015-0,017 ml de 2,5% avertin/gram de greutate corporală și se plasează pe marginile unui vas Petri, astfel încât să poată fi observată ușor la microscop.
2. Se rade părul de pe spate și se umeșește cu etanol 70%.
3. Se umple o pipetă de transfer cu embrioni. Deoarece vor fi în afara incubatorului pentru câteva minute, se transferă embrionii din mediu M16 în mediu M2, înaintea încărcării pipetei de transfer. Soluțiile și embrionii se aspiră după un anumit model în pipetă (Fig.50). În oviduct se transferă 15-30 de embrioni. În cazul transferului uterin nu se aspiră a treia bulă de aer (bulele de aer în uter pot afecta implantarea). Pentru transferul uterin, se încarcă pipeta de transfer cu maximum 8 blastociști, care vor genera cel puțin 5 nou-născuți (procent de supraviețuire de 75%). Nu se transferă mai mult de 12 embrioni la o mamă adoptivă și nu mai mult de 8 embrioni/corn uterin. Nu se recomandă nici patru sau mai puțini embrioni pe corn uterin, deoarece dacă supraviețuiesc, doar unul sau doi embrioni, ei vor crește prea mari și vor fi afectați.

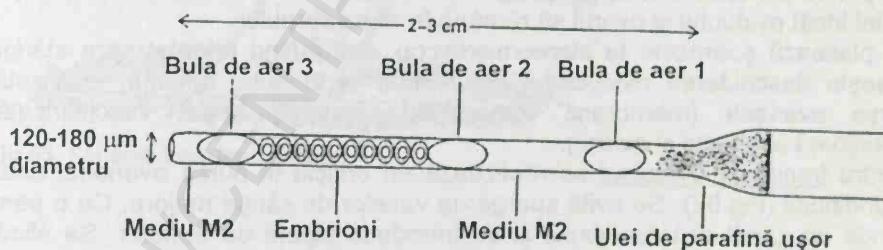


Fig.50. Compoziția pipetei de transfer.

4. Se șterge spatele femelei pseudogestante cu etanol 70% și se realizează cu un foarfece o incizie transversală mică (sub 1 cm) în tegument, la 1 cm dreapta față de măduva spinării, la nivelul ultimei coaste (Fig.51A).
5. Se trage tegumentul la dreapta sau la stânga până ce incizia este deasupra ovarului (portocaliu) sau țesutului gras (alb), ambele vizibile prin peretele corpului.

6. Se prinde peretele corpului cu pensa și se face o incizie mică chiar deasupra ovarului.
7. Cu un ac chirurgical curbat, se trece o bucată de catgut prin peretele corpului, astfel încât acesta să fie identificat ușor.
8. Se prinde țesutul gras cu o pensă cu vârful rotunjit și se scot din cavitatea abdominală ovarul drept, oviductul și uterul (Fig.51B).

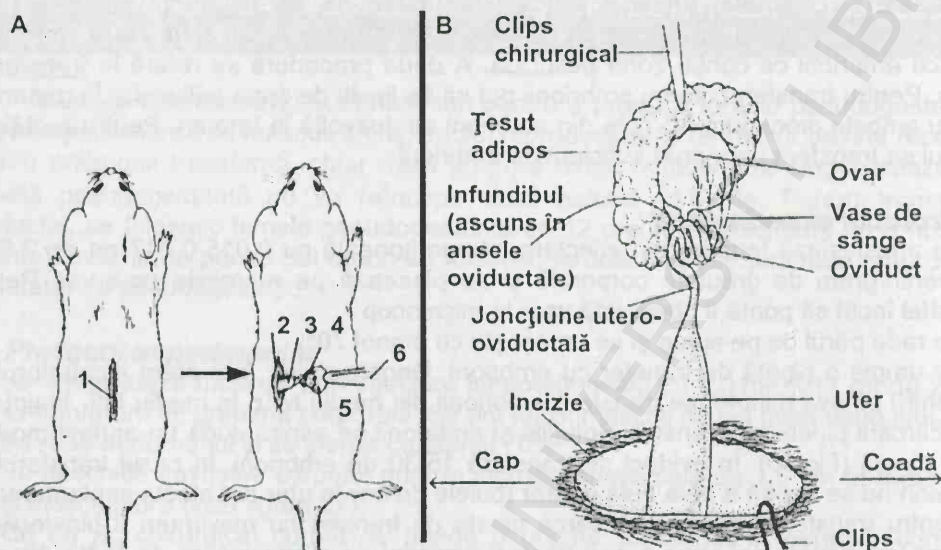


Fig.51. A-Expunerea tractului reproducător femel pentru transferul embrionilor. 1-incizie pe linia mediană dorsală; 2-incizie în peretele corpului; 3-uter; 4-oviduct; 5-țesut adipos ovarian; 6-clips Dieffenbach. B-Detaliu al transferului oviductal.

9. Se prinde un clips chirurgical de țesutul gras și se așează pe mijlocul spatelui, astfel încât oviductul și ovarul să rămână în afara corpului.
10. Se plasează șoarecele la stereomicroscop, capul fiind orientat spre stânga. Se găsește deschiderea oviductului (infundibul) și ampula, umflată, localizată sub bursa ovariană (membrană transparentă subțire, bogat vascularizată, ce înconjoară oviductul și ovarul).
11. Pentru transferul oviductal se realizează un orificiu în bursa ovariană, deasupra infundibului (Fig.52). Se evită spargerea vaselor de sânge majore. Cu o pensă se prinde un capăt al infundibului și se introduce pipeta de transfer. Se elimină în ampula oviductală conținutul pipetei de transfer, până la nivelul bulelor de aer 2 și 3. Pentru transferul uterin se realizează cu o seringă cu ac hipodermic de 25 un orificiu prin care se introduce pipeta de transfer, evitându-se vasele de sânge (Fig.53). Se elimină conținutul pipetei de transfer până în momentul în care bula de aer din apropierea blastocistilor este la vârful pipetei.
12. Se introduc uterul, oviductul și ovarul în cavitatea corpului și se suturează musculatura și tegumentul.
13. Dacă este necesar, se repetă operațiile de mai sus pentru a transfera embrioni și în oviductul sau uterul drept.

14. După transfer, femela se plasează în cușcă și se lasă liniștită într-un loc călduros. Ea își revine din anestezie în 20-30 minute.

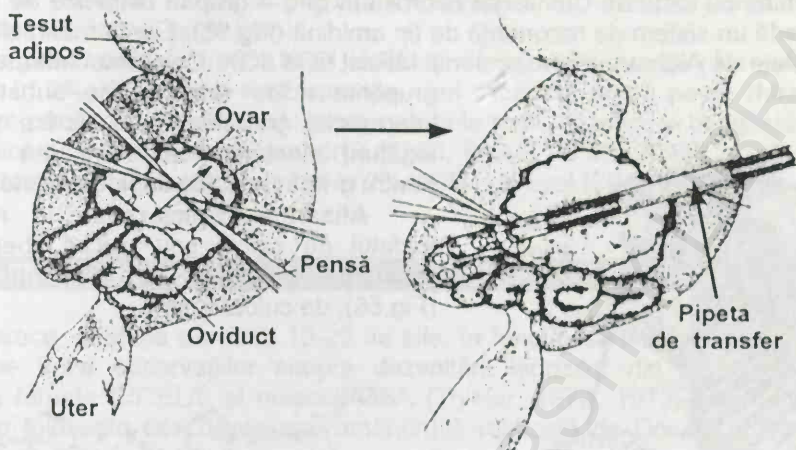


Fig. 52. Transferul embrionilor în oviduct.

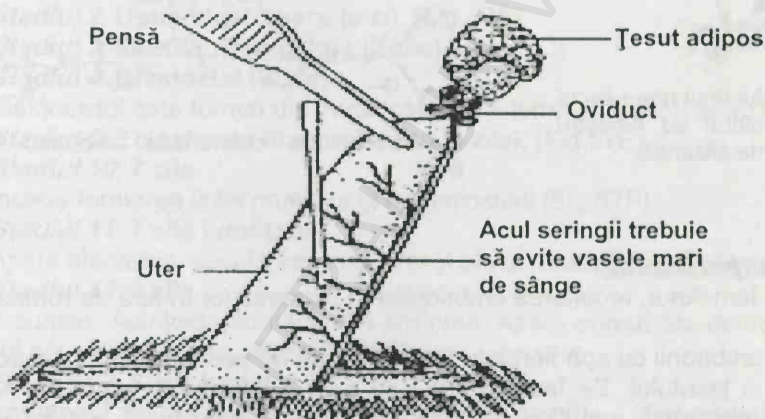


Fig.53. Schema transferului uterin.

VIII. COLORAREA *IN TOTO* A OSULUI ȘI CARTILAJULUI

În biologia dezvoltării un loc aparte îl reprezintă studiile de teratologie sau mutageneză, prin care se pot detecta diferite anomalii în cursul embriogenezei.

Colorarea *in toto* a sistemului osos și cartilaginos poate fi folosită pentru evidențierea structurilor scheletice ale embrionilor din momentul formării cartilajelor, în a douăsprăzecea zi jumătate și până în perioada post-natală.

Țesutul cartilaginos se colorează cu Albastru alcian în albastru deschis, în timp ce țesutul osos apare roșu, după colorarea cu alizarină (Fig.54, pentru varianta color

vezi Planșa I2). Tegumentul, musculatura, nervii și vasele de sânge nu se colorează, ele devenind transparente după tratamentul cu hidroxid de potasiu.

Albastrul alcian este un colorant bazic, format dintr-un nucleu central, ftalocianină cu ionul de Cu^{2+} legat coordinativ și 2-4 grupări cationice de izotiouraniu, ce posedă un sistem de rezonanță de tip amidină (Fig.55). Există mai multe preparate comerciale de Albastru alcian, cel mai utilizat fiind 8GX. Colorantul interacționează cu grupările acide reactive ale substratului, prin intermediul grupărilor sale bazice și formează legături electrostatice. Afinitatea colorantului pentru grupările acide depinde foarte mult de pH.

Alizarina complexează în mediu acid, fosfatul de calciu sau calciul liber din oase, formând precipitate de alizarinat de calciu (Fig.56), de culoare roșie.

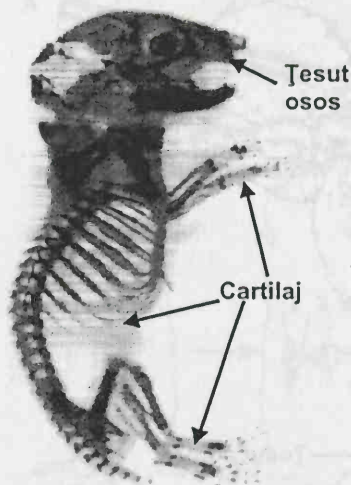


Fig.54. Scheletul unui nou-născut de șoarece colorat cu Albastru alcian și Roșu de alizarină.

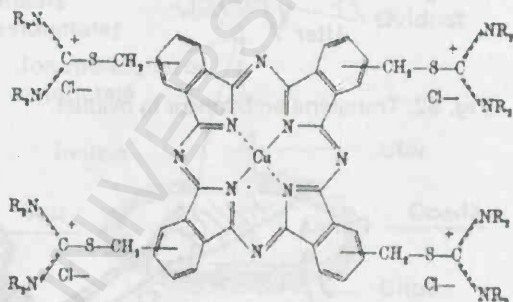


Fig.55. Structura colorantului Albastru alcian 8GX.

Protocol experimental

1. Sacrificarea femelelor, recoltarea embrionilor și plasarea lor în apă de robinet, 1-24 ore.
2. Se opăresc embrionii cu apă fierbinte ($65-70^{\circ}\text{C}$), 20-30 secunde, pentru macerarea mai ușoară a țesutului. Se îndepărtează cu grijă tegumentul cu pensa. Această operație se realizează mai bine dacă se fac incizii în jurul taliei, gâtului și bazei membrilor.
3. Eviscerarea embrionului.
4. Fixare în etanol 95%, 3-5 zile. Se verifică eliminarea bulelor de aer din cavitatea corpului.
5. Colorarea cartilajului, prin plasarea embrionului în soluția de Albastru alcian, 24 de ore. *Nu se lasă embrionii mai mult decât este necesar în soluția de Albastru alcian, deoarece țesutul osificat se va decalcifica.*
6. Se clătește embrionul de două ori în etanol 95% și se incubează în etanol 95%, două băi, câte 24 de ore fiecare baie.

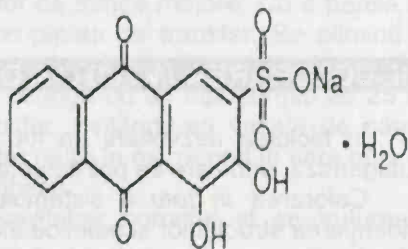


Fig.56. Structura colorantului Roșu de alizarină.

7. Clarificare prin incubare în 1% KOH, 2-6 ore. Se observă proba în timpul macerării. Dacă procesul este prea rapid se introduce în frigider pentru a încetini clarificarea. În cursul acestei etape embrionii devin transparenți.
8. Colorare cu Roșu de alizarină, preparată extemporaneu, 1-3 ore (embrionii mai tineri au nevoie de mai puțin timp).
9. Clarificare prin incubarea în 2% KOH, de diluții descrescătoare. Se plasează inițial embrionii în 2% KOH până sunt aproape clari. Această etapă poate dura de la câteva ore până la cel puțin 3 zile pentru probele mari. Clarificare completă în 2% KOH : glicerol în următoarele proporții: 80:20, 60:40, 40:60, 20:80, o oră fiecare baie. Embrionii pot fi stocați nedefiniți în 2% KOH : glicerol (20:80).

IX. STADII EMBRIONARE

La șoarece, gestația durează 19-20 de zile, în funcție de linie. S-au descris 27 de stadii, pe baza observațiilor asupra dezvoltării hibridilor din prima generație proveniți din femele C57BL/6 și masculi CBA (Thieler, 1972, 1973). Pentru stadiile gastrulării se folosește descrierea mai amănunțită realizată de Downs și Davies în 1993. Se vor ilustra stadiile embrionare reprezentative, păstrând numerotarea originară dată de autorii menționați.

Stadiul 1: Zigot (Fig.57A)

Stadiul 2: Două blastomere (o zi), (Fig.57B)

Stadiul 3: Morulă, 4-16 celule (2 zile), (Fig.57C)

Stadiul 4: Blastocist (3 zile)

Blastocistul este format din masă celulară internă și trofotoderm (Fig.57D).

Stadiul 5: Ecloziunea blastocistului (4 zile), (Fig.57E).

Stadiul 10: 7 zile

Începe formarea liniei primitive și a amniosului (Fig.57F).

Stadiul 11: 7 zile jumătate

Apare alantoida, sacul vitelin visceral și placa neurală (Fig.58A).

Stadiul 12: 8 zile

7 somite. Alantoida contactează corionul. Apare primul arc aortic. Se formează jgheabul neural și placoda otică (Fig.58B).

Stadiul 13: 8 zile jumătate

Embrionul se răsucesce. Sunt prezente 12 somite. Tubul neural este închis la nivelul somitelor 4-5 (Fig.58C-D).

Stadiul 15: 9 zile jumătate

Embrionul are o formă spirală, capătul caudal așezat pe partea dreaptă a capului. 13-30 perechi de somite. Neuroporul cranial se închide. Apar placodele olfactive și cristalinene, în timp ce placoda otică se invaginează. Apar primele două arcuri branhiale (Fig.58E).

Stadiul 17: 10 zile jumătate

35-39 somite. Mugurii membrilor sunt curbați înainte și median. Există o cută marginală distinctă în jurul placodelor olfactive invaginate. La începutul acestui stadiu vezicula cristaliniană formează o invaginație adâncă. Procesele maxilare și mandibulare ale primului arc branhial se văd clar. Se pot observa prin ectoderm vezicule cerebrale distincte. Este prezent rudimentul cozii (Fig.58F).

Stadiul 19: 11 zile jumătate

Se caracterizează printr-o applatizare a mugurilor membrilor anterioare. În mugurii membrilor posterioare începe diferențierea componentele piciorului și tălpii. Invaginările olfactive sunt foarte adânci. Somitele cervicale nu mai sunt vizibile. Coada continuă să se alungească. Embrionul măsoară 6-7 mm (Fig.59A).

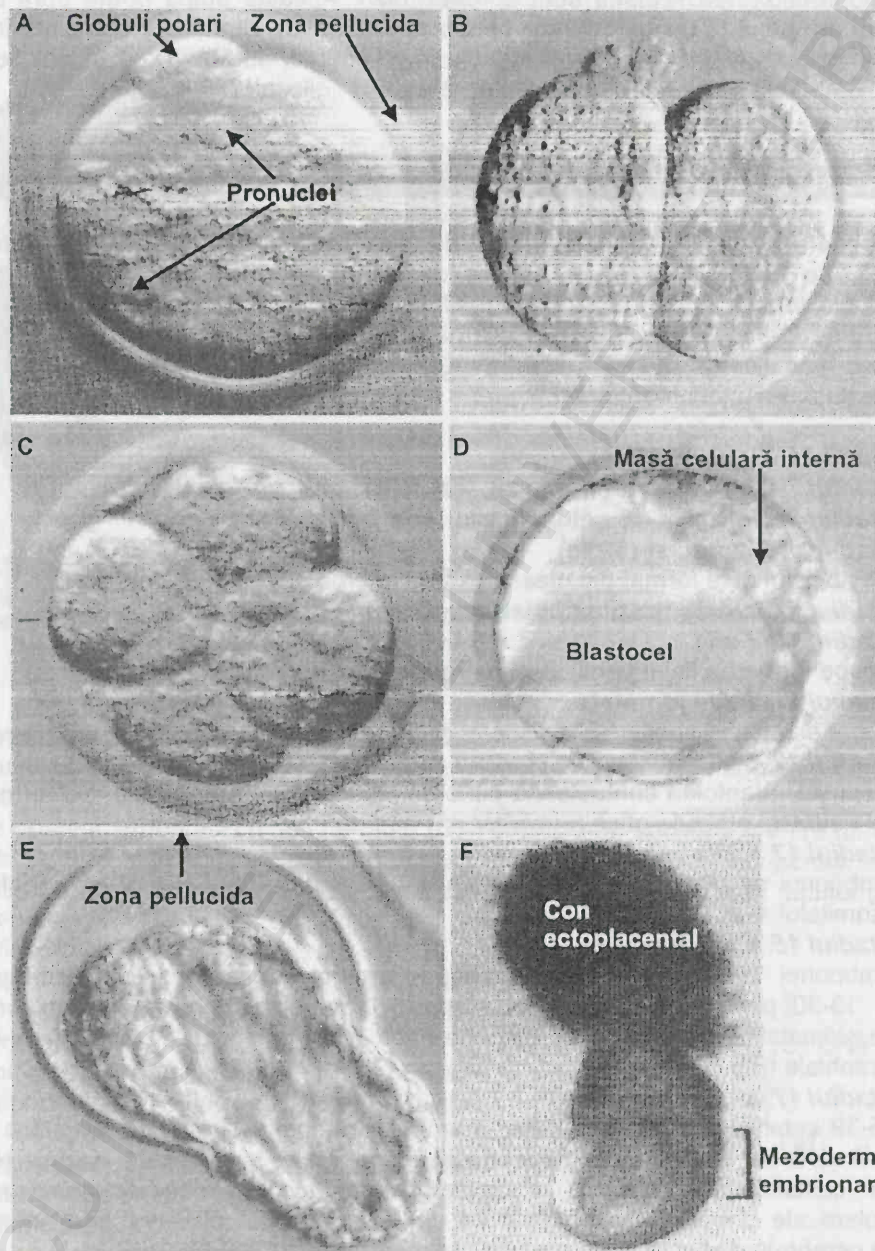


Fig.57. Dezvoltarea embrionară la șoarece. A-Zigot. B-Două blastomere. C-Patru blastomere. D-Blastocist. E-leșirea blastocistului din zona pellucida. F-Embrion de 6,75-7,25 zile.

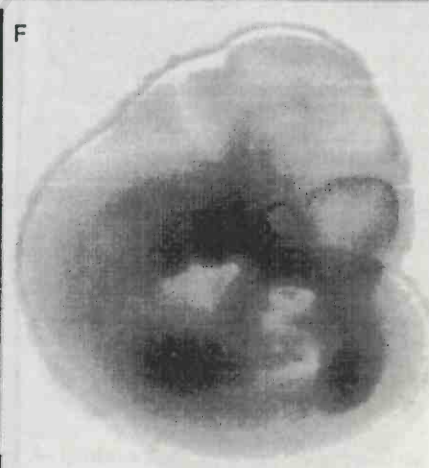
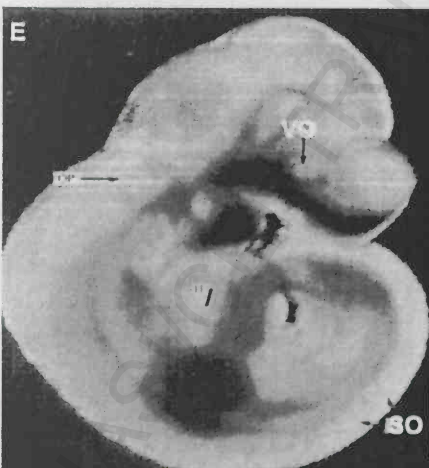
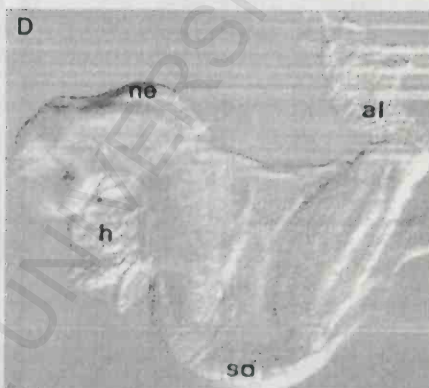
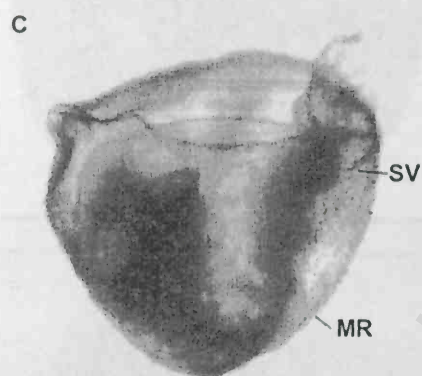
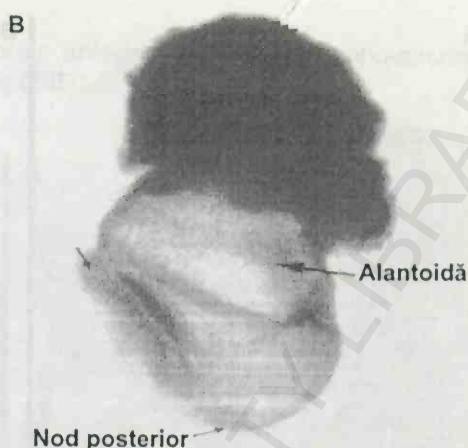
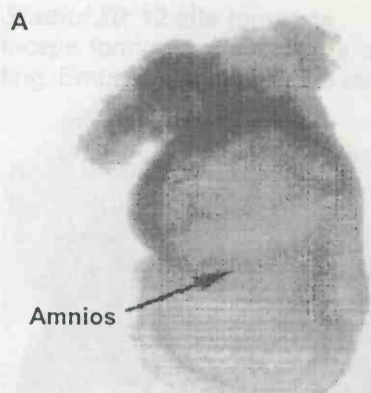


Fig.58. Dezvoltarea embrionară la șoarece. **A**-Embrion de 7,25-7,75 zile. **B**-Embrion de 7,5-8 zile. **C**- Embrion de 8,5 zile. SV-sac vitelin visceral. MR-membrana Reichert. **D**- Embrion de 8,5 zile după îndepărtarea sacului vitelin și a membranei Reichert. al-alantoida. h-inima. ne-ectoderm neural. **E**-Embrion de 9,5 zile. I-inima; SO-somite; VO-veziculă optică; **F**-Embrion de 10,5 zile.

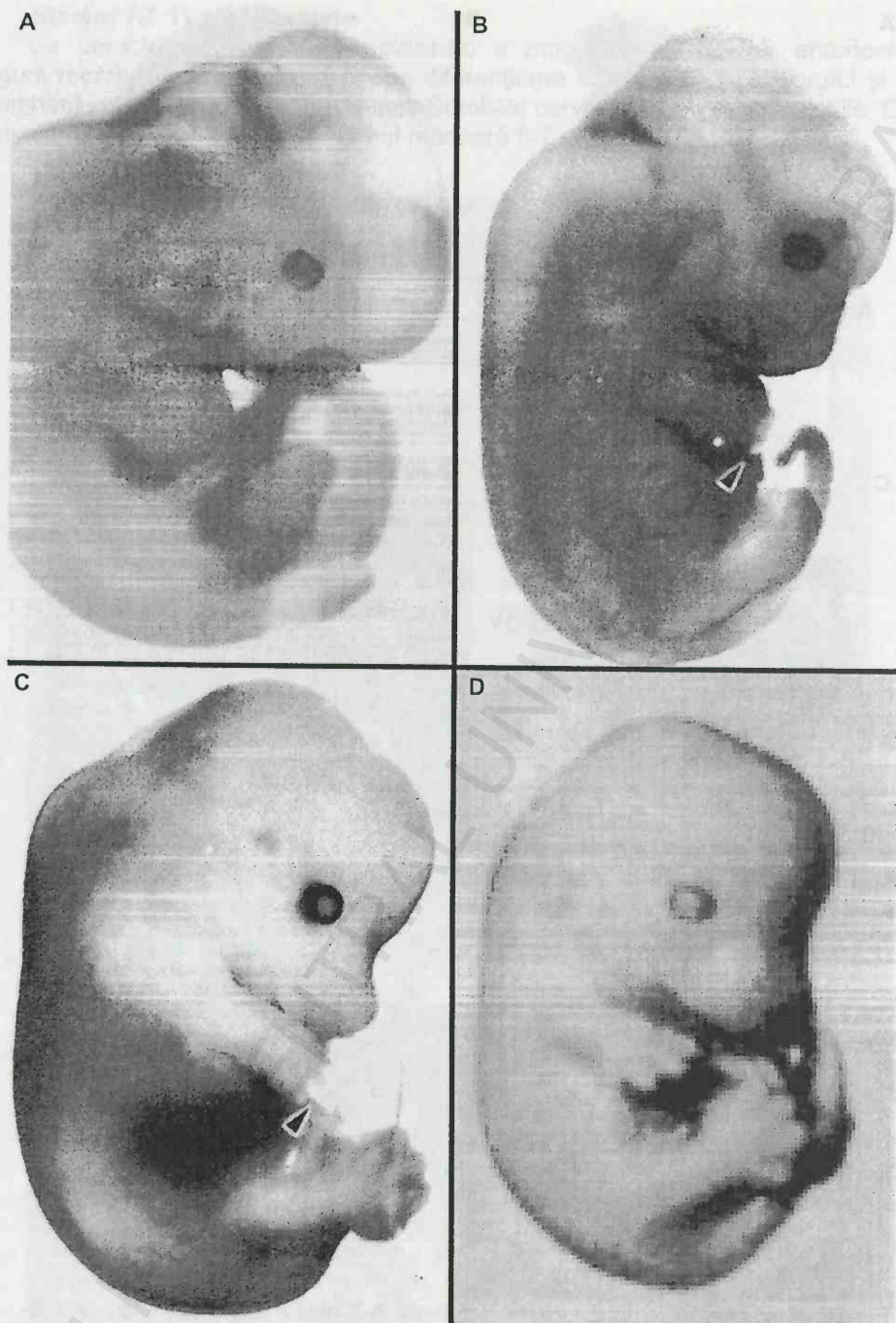


Fig.59. Dezvoltarea embrionară la șoarece. A-Embrion de 11,5 zile. B-Embrion de 12,5 zile. C-Embrion de 13,5 zile. D-Embrion de 14 zile.

Stadiul 20: 12 zile jumătate

Începe formarea degetelor la membrele anterioare. Somitele lombo-sacrale nu se disting. Embrionul măsoară 7-9 mm (Fig.59B).

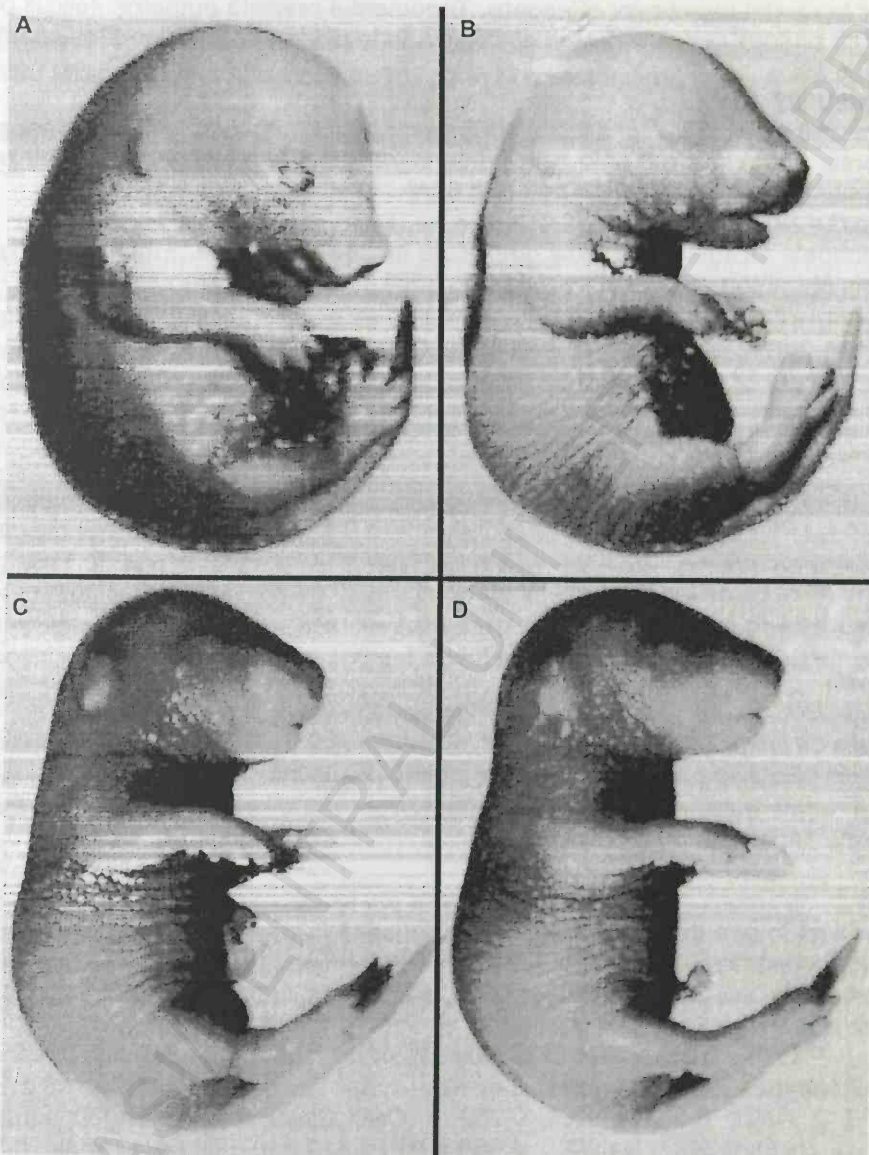


Fig.60. Dezvoltarea embrionară la șoarece. A- Embrion de 15 zile. B- Embrion de 16 zile. C-Embrion de 17 zile. D-Embrion de 18 zile.

Stadiul 21: 13 zile jumătate

Apar mustățile. Aproape de sfârșitul acestui stadiu se disting foliculii piloși, proeminenți deasupra ochilor și în fața fiecărei urechi. La embrionii mai tineri pleoapele nu acoperă încă globul ocular. Somitele sunt vizibile doar în coadă. În

embrionii mai avansați pleoapele acoperă porțiunile superioare și inferioare ale globilor oculari. Embrionul măsoară 9-10 mm (Fig.59C).

Stadiul 22: 14 zile

Degetele membrelor anterioare sunt complet separate. Începe separarea degetelor la nivelul membrelor inferioare. Tegumentul prezintă numeroși foliculi piloși, cu excepția regiunii capului. Hernia ombilicală este evidentă. Embrionul măsoară 11-22 mm (Fig.59D).

Stadiul 23: 15 zile

Aspectul caracteristic al acestui stadiu este separarea completă a degetelor atât la membrele anterioare cât și la cele posterioare. Foliculii piloși sunt prezenți pe tot corpul. Embrionul măsoară 12-24 mm (Fig.60A).

Stadiul 24: 16 zile

Pleoapele fuzionează. Hernia ombilicală începe să dispară. Embrionul măsoară 14-17 mm. Membrana Reichert se rupe (Fig.60B).

Stadiul 25: 17 zile

Hernia ombilicală a dispărut. Embrionul măsoară 17-20 mm (Fig.60C).

Stadiul 26: 19 zile jumătate

Sfârșitul gestației (Fig.60D).

X. MEDII ȘI SOLUȚII

■ Albastru alcian

20 mg Albastru alcian 8GX; 80 ml etanol 95%; 20 ml acid acetic glacial.
Colorare 24 de ore

■ Avertin

Soluție stoc 100%: 10 g alcool tribromoetilic; 10 ml alcool amilic terțiar.

Soluție de lucru: 25% din soluția stoc, diluată în apă distilată sterilă.

Ambele soluții se păstrează la 4°C, protejate de lumină.

Doza administrată intraperitoneal: 15-17 μ l 100% avertin/g corp. Șoarecele rămâne anesteziat 30-60 minute.

■ HCG

500 UI/ml în apă distilată sterilă. Se porționează în doze de 100 μ l, se liofilizează și se stochează la -20°C, ferită de lumină. În momentul utilizării se resuspendă un volum de 100 μ l într-un ml de 0,9% NaCl (concentrație finală 50 UI/ml). Se injectează 0,1 ml în fiecare animal.

■ Mediu de cultură M2

5,533 g NaCl; 0,356 g KCl; 0,252 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,162 KH_2PO_4 ; 0,293 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,349 g NaHCO_3 ; 4,969 g HEPES; 2,610 g lactat de sodiu; 0,036 g piruvat de sodiu; 1 g glucoză; 4 g albumină serică bovină; 0,060 g penicilină G; 0,050 g streptomycină; 0,010 g roșu fenol; la 1000 ml apă bidistilată, pH 7,2-7,4 cu 0,2 N NaOH. Se filtrează mediul prin filtru Millipore. Se poate stoca la 4°C, până la o săptămână.

■ **Mediu de cultură M16**

5,533 g NaCl; 0,356 g KCl; 0,252 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,162 g KH_2PO_4 ; 0,293 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,101 g NaHCO_3 ; 2,610 g lactat de sodiu; 0,036 g piruvat de sodiu; 1 g glucoză; 0,060 g penicilină G (conc. finală 100 unități/ml); 0,050 g streptomicină (conc. finală 50 mg/ml); 0,010 g roșu fenol; la 1000 ml apă bidistilată. Mediul se echilibrează gazos cu 5% CO_2 , 95% aer, 5 minute pentru a ajusta pH-ul (această etapă se omite dacă pH-ul este 7,4). Se filtrează mediul prin filtru Millipore. Se poate stoca la 4°C până la o săptămână.

■ **Mediu Eagle modificat Dulbeco (DMEM)**

Soluții stoc: DMEM (Gibco, glucoză 4 g/l)

200 μM glutamină

5000 $\mu\text{g/ml}$ penicilină/streptomicină

Soluție de lucru: Se dizolvă cu agitare ușoară conținutul unui pachet de pudră DMEM, în 4,75 l apă distilată. Se adaugă 11 g NaHCO_3 . Se aduce la 5 l cu apă distilată. Se ajustează pH-ul la 7,2-7,4 cu 1N NaOH sau 1N HCl. Sterilizare imediată prin filtrare. *pH-ul crește de obicei cu 0,1-0,3 unități după filtrare.* Înaintea folosirii în cultură, la 1 l DMEM se adaugă 10 ml soluție glutamină și 10 ml soluție penicilină. Soluții proaspete de glutamină și penicilină/streptomicină se adaugă la soluția de lucru după două săptămâni. Soluția de lucru poate fi păstrată, 4 săptămâni de la preparare, la 4°C.

■ **Mediu Whittingham**

0,5803 g NaCl; 0,2106 g NaHCO_3 ; 0,1 g glucoză; 0,0201 g KCl; 0,0056 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,0055 g piruvat de sodiu; 0,0063 g penicilină; 0,0050 g streptomicină; 0,0264 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,0102 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,35 ml 60% lactat de sodiu; 0,1 g roșu fenol; la 100 ml apă bidistilată. Se filtrează mediul prin filtru Millipore, se porționează în volume de 10 ml și se congelează.

■ **PMSG**

50 UI/ml în 0,9% NaCl. Soluție sterilă. Se porționează și se stochează la -20°C, cel puțin o lună. Se injectează în fiecare animal o doză de 1 ml.

■ **Roșu de alizarină**

5 mg Roșu de alizarină; 100 ml 2% KOH.

Colorare 1-3 ore.

■ **Soluție hialuronidază pentru îndepărtarea celulelor cumulusului oophorus**

Soluție stoc: 10 mg/ml hialuronidază tip IV-S din testicul bovin (Sigma), în mediu M2 sau apă. Se sterilizează, se porționează și se stochează la -20°C.

Soluție de lucru: Se diluează soluția stoc, la o concentrație de 300 $\mu\text{g/ml}$, în mediu M2 cu albumină serică bovină.

■ **Soluție pancreatină-tripsină**

2,5% pancreatină; 0,5% tripsină; 0,5% polivinilpirolidonă (opțional) în tampon fosfat salin. Suspensia este dificil de sterilizat prin filtru Millipore de 0,45 μm , fără centrifugare ușoară sau prefiltrare prin filtru Whatman No. 1. Se porționează și se stochează la -20°C.

■ Soluție tripsină - EDTA

0,25% tripsină; 0,02% EDTA; în tampon fosfat salin, pH 7,2.

■ Tampon fosfat salin

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 ; la 1000 ml apă distilată.
Când se folosește pentru cultura țesuturilor, pH-ul este 7,2. Pentru alte scopuri pH-ul este 7,4.

CAPITOLUL

2

METODE DE TRANSGENEZĂ ȘI
MUTAGENEZĂ DIRECȚIONATĂ

Transgeneza este una din tehnicile de bază în biologia dezvoltării. Dacă vrem să înțelegem complexitatea reglării și funcționării genelor, trebuie să studiem rolul și controlul expresiei genice în contextul unui organism întreg. Tehnicile transgenice permit transferul unei gene clonate într-un genom gazdă sau modificarea unor secvențe genomice specifice, prin intermediul mutagenezei direcționate în celulele stem embrionare. Cel mai adesea, experimentele de transfer genic au fost folosite pentru a studia efectele fenotipice determinate de exprimarea ectopică sau hiperexprimarea unei transgene, sau pentru investigarea mecanismelor transcripționale care guvernează reglajul genic embrionar. Înaintea cercetărilor transgenice singurele metode disponibile pentru studierea reglării și funcționării genelor în contextul organismului întreg au fost mutațiile. Această abordare a fost denumită „*genetică directă*”, adică de la fenotip la genă. Identificarea moleculară și caracterizarea genei mutante sunt procedee dificile din punct de vedere tehnic.

Funcția genelor și reglajul genic pot fi studiate în culturi celulare, evaluarea exprimării genice în aceste sisteme fiind relativ simplă. Deoarece, nu sunt întotdeauna disponibile liniile celulare corespunzătoare celulelor diferențiate de interes s-au folosit tipuri celulare heteroloage, care au o valoare fiziologică limitată. În plus, activitatea unei gene specifice la nivel celular nu furnizează informații satisfăcătoare despre reglarea genei în animalul întreg. Chiar și cel mai bun sistem de culturi celulare nu poate simula organizarea țesuturilor și organelor. Nici o linie celulară sau sistem de cultură nu poate modela plasticitatea și ansamblul de stimuli la care celulele sunt expuse în mod normal.

Transgeneza a permis așa numita „*genetică inversă*”, de la genă la fenotip. Astfel, o secvență genică caracterizată, poate fi evaluată în contextul unui animal întreg, fără a avea informații despre reglarea sau funcția ei.

Progresele realizate în ultimii ani în biologia dezvoltării au depins în mare măsură de generarea de organisme mutante și transgenice, deoarece funcția

¹Genetica inversă este un termen propus inițial pentru a sugera că este opusă celei clasice, cunoscute sub denumirea de genetică directă, în care studiile începeau de la identificarea proteinei. Din punct de vedere al logicii proceselor moleculare, situația este de fapt inversă, genetica inversă fiind de fapt abordarea directă, normală a proceselor biologice, care încep cu transcrierea genei și sfârșesc cu formarea proteinei.

potențială a unei gene poate fi testată prin inactivarea, înlocuirea sau hiperexprimarea ei, urmate de analiza fenotipului mutant.

Acest capitol își propune să prezinte principalele strategii moleculare de producere a animalelor transgenice și modul în care acestea pot contribui la descifrarea embriogenezei moleculare.

Animalele care exprimă gene străine se numesc **transgenice**, ADN-ul străin introdus fiind cunoscut sub denumirea de **transgenă**. Datorită integrării transgenei în linia germinală a animalelor transgenice fondatoare, ea va fi prezentă în toate celulele animalelor din prima generație. Acest aspect implică studierea exprimării unei transgene pe tot parcursul embriogenezei și în toate tipurile celulare.

Procedeul de obținere a animalelor transgenice este cunoscut și sub denumirea de **mutagenезă inserțională**.

În funcție de specie există mai multe metode de introducere a genelor străine într-un organism: (1) elemente transpozabile; (2) vectori retrovirali; (3) injectarea în nucleii spermatozoizilor; (4) injectarea în pronucleii ovulelor fecundate; (5) celule stem embrionare.

Tehnicile asociate cu blocarea funcției unei gene poartă denumirea de **knock-out**. Acesta poate fi realizat la nivel genic, prin înlocuirea genei endogene cu o copie nefuncțională sau la nivel post-transcripțional cum este cazul tehnicilor ARNi și a celor care folosesc oligonucleotide antisens.

I. ELEMENTE TRANPOZABILE

Majoritatea metodelor de transgenезă la *Drosophila* se bazează pe folosirea elementelor transpozabile și anume a elementului *P*. Aceste metode sunt cunoscute și sub denumirea colectivă de mutagenезă inserțională mediată de elementul *P*.

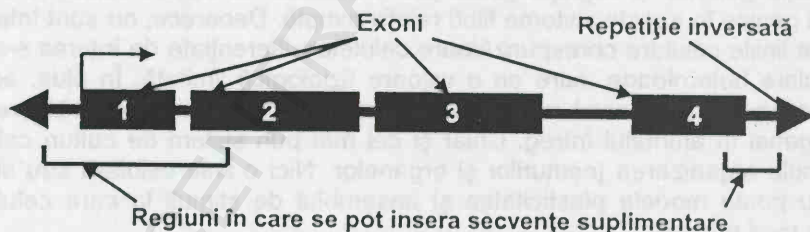


Fig. 61. Schema elementului *P* la *Drosophila*.

Elementul *P* de 2.907 pb include o repetiție inversată de 31 pb, la fiecare capăt și o genă formată din patru exoni, ce codifică transpozaza *P* (Fig.61). Aproape orice secvență genică poate fi plasată între cele două repetiții. Inserția elementului *P* poate fi urmărită fenotipic prin introducerea unor gene marker, de obicei genele *white* sau *rosy*, care determină culoarea ochilor. Pot fi incluse însă secvențe suplimentare, pentru a furniza alte aspecte. Transpoziția se realizează printr-un mecanism de tăiere și lipire. În prima fază, de excizie, transpozaza clivează în interiorul celor două repetiții inversate, pentru a îndepărta un fragment de 17 nucleotide, cu capete monocatenare

3'. În a doua fază, elementul se integrează într-un situs țintă de 8 pb, duplicat la fiecare capăt al inserției.

Deși mecanismul de inserție la un anumit situs cromozomial este necunoscut s-au observat câteva aspecte generale: (1) inserția are loc mai frecvent în situsurile de eucromatină decât cele de heterocromatină; (2) unii loci de eucromatină sunt mult mai susceptibili la mutagenеза mediată de elementul P decât alții; (3) inserția are loc preferențial în secvențele necodificatoare situate înaintea genei; (4) situsurile țintă complementare cu secvența octamerică GGCCAGAC sunt mai frecvente pentru inserția elementului P; (5) elementele P au tendința de a se insera în sau lângă alte elemente P, cu o preferință pentru perechile de baze 19-26 din alt element P; (6) unele elemente P pot suferi transpoziția la situsuri înrudite cu cel donor.

În celulele somatice represia transpoziției elementului P are loc la nivelul procesării ARN. Intronii 2 și 3 sunt procesați doar în celulele germinale, determinând absența transpozazei din celulele somatice. Procesarea acestui intron este împiedicată în celulele somatice de o proteină de 97 kDa, care se leagă la un situs în exonul 2, localizat la 12-31 de baze de situsul de procesare 5'.

Determinanții liniei germinale sunt localizați în polul posterior al oului unde formează plasma polară. Astfel, ADN injectat în citoplasma corticală posterioară poate fi încorporat în nou formatele celule germinale. Rubin și Spradling (1982) au elaborat o metodă de transformare bazată pe introducerea ADN în linia germinală, folosind elemente transpozabile. Pentru generarea de musculițe transgenice se injectează două plasmide în polul posterior al embrionilor homozigoți *rosy*, în stadiul de blastoderm. Prima plasmidă, numită și donoare conține transgena, o genă marker (*rosy*), ambele capete ale elementului P, ce facilitează inserția și gena raportoare *lacZ*, ce codifică β -galactozidaza, pentru detectarea histochimică. Uneori plasmida donoare poate conține și un promotor de șoc termic, care facilitează exprimarea transgenei, după incubarea embrionilor la temperatură. A doua plasmidă, numită și ajutătoare conține elementul P cu gena transpozazei, dar și o mutație la unul din capete, pentru a împiedica transpoziția. Astfel, transpozaza produsă de plasmida ajutătoare catalizează transferul întâmplător al plasmidei donoare în genomul embrionilor. În prima generație, toate musculițele au ochii albi, pentru că elementul P este prezent doar în linia germinală. În a doua generație, unele musculițe au ochii roșii, ceea ce indică integrarea transgenei în celulele somatice.

În funcție de scopul urmărit, elementul P poate fi construit în următoarele două variante de bază: (a) pentru captarea unui enhancer endogen - "enhancer trap"; (b) exprimare ectopică (Adams și Sekelsky, 2002).

Captarea unui enhancer

Este o metodă care se bazează pe capacitatea unei gene de a activa alte gene și a fost folosită pentru identificarea de regiuni enhancer noi și genele pe care le controlează. Constructul genetic conține: (1) o genă raportoare de tipul *lacZ* sau GFP fuzionată cu un promotor relativ slab, care nu va iniția transcripția genei raportoare, fără ajutorul unui enhancer endogen; (2) genă marker *mini-white*. Constructul genetic este introdus în ou, unde se integrează întâmplător în genom. Dacă se integrează lângă o regiune enhancer, gena raportoare se va exprima în momentul în care regiunea enhancer este activată. Modelul exprimării genei raportoare va fi identic cu modelul exprimării genei cu care este asociată în mod normal regiunea enhancer. Prin izolarea regiunii activate se poate descoperi gena activată de enhancer.

Exprimare ectopică

Activatorul transcripțional de la drojdii denumit GAL4 poate fi folosit pentru a regla exprimarea genelor la *Drosophila*. GAL4, ce codifică o proteină de 881

aminoacizi, funcționează ca reglator transcripțional al genelor induse de galactoză, prin legarea directă la patru situsuri, de câte 17 pb fiecare. Aceste situsuri definesc o secvență activatoare (UAS²), analoagă unui enhancer, localizată înaintea regiunii codificatoare. Legarea de ADN este conferită de primele 74 resturi de aminoacizi; în timp ce activarea transcripțională este realizată de două regiuni cuprinse între resturile de aminoacizi din pozițiile 148-196 și 768-881.

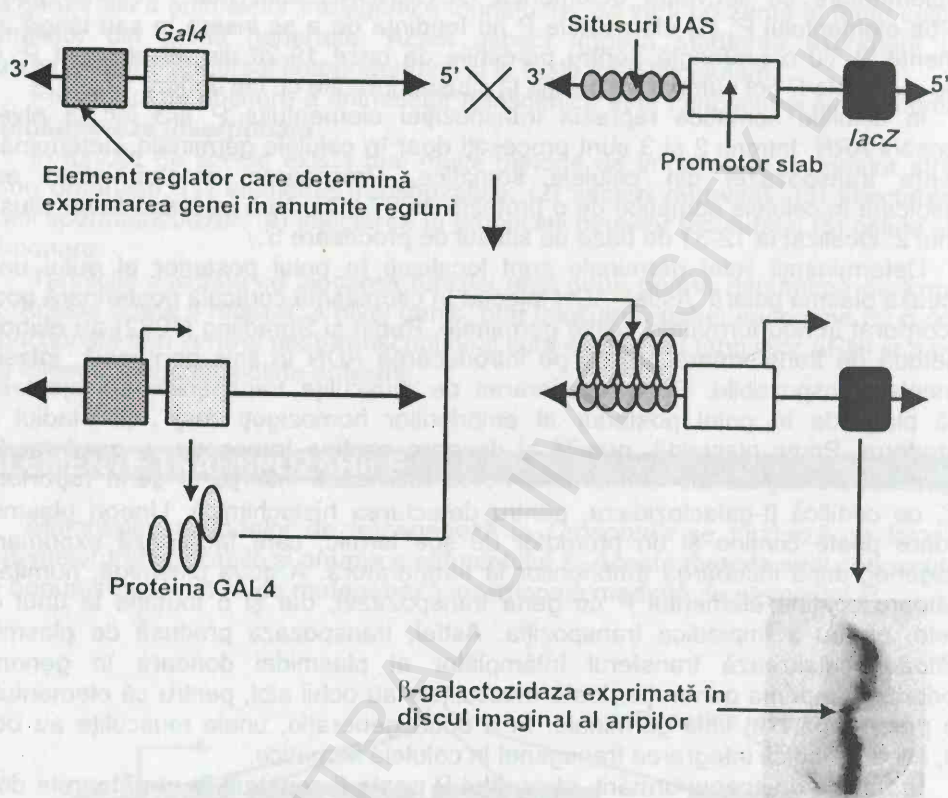


Fig.62. Sistemul bipartit UAS/GAL4 la *Drosophila*. (Adaptată după Duffy,2002).

În 1988 Fischer și col., au demonstrat la *Drosophila* că GAL4 poate induce transcrierea unei gene raportoare sub controlul UAS. Un aspect foarte important al exprimării GAL4 la *Drosophila* este acela al lipsei efectelor fenotipice. Inducerea exprimării temporale și spațiale a genelor reprezintă una din cele mai importante tehnici pentru elucidarea funcției genelor *in vivo*. În 1993, Brand și Perrimon au publicat o metodă de exprimare genică direcționată *in vivo*. În acest sistem, exprimarea genei raportoare este controlată de prezența elementului UAS (5 elemente UAS așezate în tandem). Musculițele ce conțin gena raportoare (de exemplu *GFP* sau *lacZ*) nu o pot exprima deoarece nu conțin GAL4. Pentru activarea transcripției genei raportoare, sunt încrucișate femele care poartă gena și elementele

²Upstream Activating Sequence

UAS, cu masculi ce exprimă GAL4 (Fig.62). Acest sistem bipartit, în care cele două componente sunt menținute ca linii parentale separate are numeroase avantaje. În primul rând, inactivitatea transcripțională a liniei parentale ce poartă gena de interes permite realizarea de linii transgenice, în care produșii genici sunt toxici, letali sau determină viabilitate redusă. De exemplu, există linii pentru gene de tipul *ricin a*, ce codifică un produs toxic sau *reaper*, care întinde apoptoza. Când musculițele purtătoare ale acestor gene sunt încrucișate cu musculițe ce conțin GAL4, are loc transcrierea genelor și în consecință în prima generație se poate observa letalitate, reducerea viabilității sau apoptoză. În al doilea rând, acest sistem permite exprimarea oricărei gene într-o varietate de modele spațiale și temporale prin împerecherea cu linii GAL4 distincte. Progenitura rezultată exprimă gena de interes într-un model spațial ce reflectă prezența GAL4. La *Drosophila*, activitatea minimală a GAL4 are loc la 16°C, în timp ce temperatura de 29°C furnizează un echilibru între activitatea maximă a GAL4 și efecte minime asupra fertilității și viabilității, datorate dezvoltării la temperatură ridicată. Astfel, prin simpla modificare a temperaturii se pot realiza o gamă largă de niveluri de exprimare ale oricărei gene (Duffy,2002). Acest aspect este avantajos mai ales în studiile pe stadiile post-embrionare. Gena *Gal4* se inseră în poziții întâmplătoare în genomul de *Drosophila*. Există acum o colecție mare de linii ce exprimă *Gal4* într-o varietate uriașă de tipuri celulare și modele specifice de țesut.

Plasarea unei gene ce codifică GAL4 după o regiune enhancer, care se exprimă în mod normal în cursul dezvoltării antenelor, determină exprimarea acesteia în țesutul antenal. Se realizează al doilea construct, în care se plasează ADNc al unei gene (de exemplu, *Pax6*, implicată în morfogeneza ochilor), după o secvență formată din patru situsuri UAS. GAL4 ar trebui sintetizat numai într-un anumit grup de celule destinate să formeze antenele. În celulele în care este activată gena *Gal4* este transcrisă și gena *Pax6*. În consecință o parte a antenei formează ochi.

Sistemul GAL4/UAS este asociat adesea cu analiza fenotipurilor de hiperexprimare a genei de interes („gain-of-function”). Recent, combinarea acestui sistem cu tehnologia ARNi a permis evaluarea și a fenotipurilor „loss-of-function”.

Protocol experimental

Metoda de injectare este rapidă și eficientă. Este necesară o oră pentru injectarea unui probe și un cercetător poate injecta 5-6 probe pe zi. 80% din embrioni supraviețuiesc până în stadiul de adult. Frecvența transformării poate varia considerabil în funcție de constructul ADN injectat. Pentru construcții ce nu exprimă proteine care afectează supraviețuirea embrionului, 30-50% din musculițele care supraviețuiesc produc progenitură transformată (Voie și Cohen,1998).

1. Într-un interval de 30 minute, se colectează 200-250 de ouă, înaintea formării celulelor germinale.
2. Cu o pensulă se transferă embrionii într-un recipient (tub Eppendorf), care prezintă la fund o plasă. Embrionii pot fi îndepărtați ușor de pensulă dacă recipientul este imersat parțial în apă, într-un vas Petri mic. Se spală embrionii cu apă.
3. Se îndepărtează excesul de apă, prin tamponarea ușoară a tubului cu hârtie de filtru.
4. Se îndepărtează corionul, prin plasarea embrionilor 1-3 minute, într-un vas Petri mic, cu 1,7% hipoclorit de sodiu. Îndepărtarea corionului poate fi monitorizată la

³Strategie genetică prin care se urmărește reducerea sau anularea exprimării unei gene.

microscop. În momentul în care corionul este dizolvat, embrionii apar strălucitori și se vor lipi unii de alții, deoarece anvelopa vitelină este hidrofobă.

5. Se spală embrionii cu câțiva mililitri de apă. Se plasează recipientul într-un vas Petri.
6. Pentru injectare, embrionii se transferă cu ajutorul unei pensule, pe un suport (5X50 mm) reprezentat de mediu solid plasat pe o lamă de microscop. Acest procedeu menține embrionii umezi și oferă o suprafață deformabilă, care minimizează alterările mecanice. Odată plasați pe mediu, embrionii sunt aliniați cu ajutorul unui ac spatulat. Embrionii trebuie orientați astfel încât capătul anterior să fie aproape de capătul mediului (Fig.63). Embrionii sunt orientați în aceeași direcție, unul lângă altul, dar fără să se atingă.

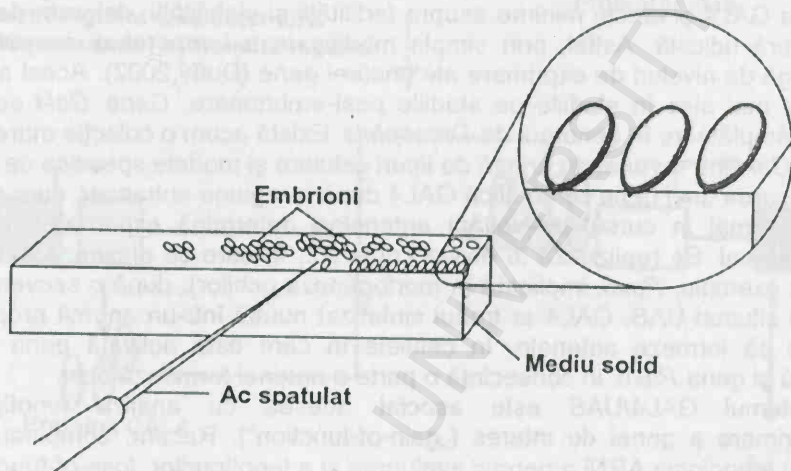


Fig.63. Aranjarea embrionilor pentru microinjectare.

7. Se culege primul rând de embrioni folosind o lamelă (24 X 60 mm), ce conține pe o margine bandă adezivă dublă, de 5 mm. Se lasă ușor lamela cu banda adezivă peste embrioni, astfel încât capătul posterior va rămâne în afara lamelei.
8. Înaintea injectării, embrionii sunt uscați ușor, pentru a reduce presiunea hidrostatică. Aceasta este etapa cea mai critică. *Uscarea excesivă omoară embrionii, în timp ce uscarea incompletă îi face dificil de injectat, deoarece citoplasma se scurge afară. Timpul de uscare optimă depinde de umiditatea și temperatura camerei în care are loc injectarea.* Pentru uscare se plasează lamela cu embrionii deasupra unui vas Petri inversat, într-un container mic, cu silica gel pentru uscare. Se usucă embrionii 10 minute.
9. După uscare se acoperă embrionii cu un strat subțire de ulei Voltalef 10, care previne uscarea suplimentară și permite schimbul de gaze.
10. Se plasează lamela cu embrioni pe o lamă de microscop. Se pune o picătură de ulei între lamelă și lamă pentru aderare. Se plasează lamela la 0,5 mm de capetele lamei. Se plasează lama la micromanipulator. Un rând de 80 de embrioni poate fi injectat în mai puțin de 10 minute. Acul de injectare trebuie să fie perpendicular pe punctul de penetrare. Se împinge acul prin membrana vitelină în citoplasmă, în

polul posterior al embrionului (Fig.64). La scoaterea acului nu trebuie să iasă citoplasmă.

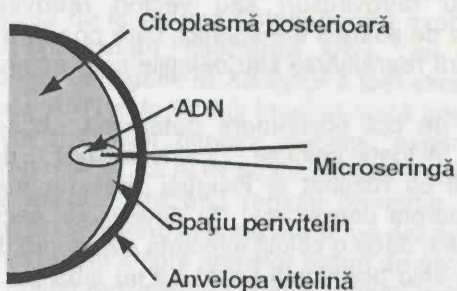


Fig.64. Reprezentarea schematică a microinjectării.

11. După ce tot rândul de embrioni a fost injectat se plasează lama într-o cameră de stocare umedă (Fig. 65) pentru a permite dezvoltarea. În următoarea zi vor ecloza larvele care pot fi colectate de pe lamă la microscop și transferate într-un recipient cu mediu de cultură.

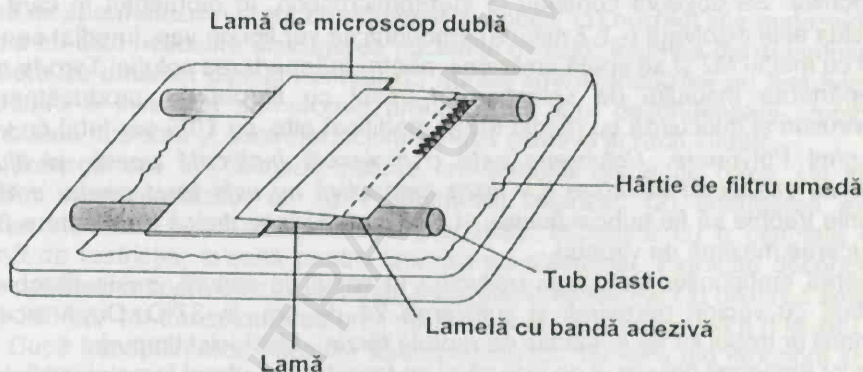


Fig.65. Schema camerei de stocare.

II. INFECTAREA EMBRIONILOR CU VECTORI RETROVIRALI

Embrionii pre sau post-implantaționali de șoarece pot fi infectați cu retrovirusuri sălbatice sau recombinat pentru integrarea stabilă a genomurilor virale în cromozomii gazdă. Integrarea are loc preferențial la nivelul situsurilor hipersensibile la DNază I, frecvent la extremitatea 5' a genelor active. Integrarea este aleatoare și are loc în orice genă a cărei funcționare va fi perturbată. "Leziunea genetică" este recesivă la animalele transgenice, care sunt heterozigote. O parte din heterozigoți poartă gena în linia germlinală. Aceștia se încrucișează între ei pentru obținerea de șoareci homozigoți pentru transgenă. Deși folosirea vectorilor retrovirali pentru transgeneză

are câteva avantaje, metoda nu este foarte folosită din următoarele motive: (1) etape suplimentare pentru producerea de retrovirusuri recombinante cu titruri mari; (2) frecvență mai mare de mozaicism; (3) evenimente de inserție multiple; (4) dificultăți în exprimarea genelor introduse în vectori retrovirali. Cu toate acestea, pentru scopurile mutagenizei inserționale, infecțiile cu retrovirusuri sau vectori retrovirali sunt avantajoase, deoarece permit generarea de șoareci transgenici, care poartă o singură copie, intactă, a provirusului integrat, fără rearanjările sau delețiile care acompaniază adesea inserțiile transgenei.

Infectarea embrionilor în stadiul de opt blastomere determină obținerea de șoareci mozaic, care nu conțin virusul în toate celulele. Ocazional, pot fi detectate inserții multiple la progenitură, probabil ca rezultat al inserției virale în mai multe celule. Integrarea aleatoare are următoarele consecințe: (1) detectarea secvențelor virale în șoarecele fondator poate fi dificilă, dacă o celulă infectată contribuie doar la o mică parte a fătului; (2) integrarea în linia germinală poate să nu aibă loc la toate animalele; (3) efectul oricărei gene purtate de retrovirus poate fi dificil de accesat.

Protocol experimental

1. Recolarea embrionilor de opt blastomere, la două zile de la împerechere, prin spălarea oviductelor cu mediu M2.
2. Îndepărtarea zonei pellucida cu soluție Tyrode acidă. Se transferă embrionii cu o pipetă dintr-o picătură de mediu de cultură, într-un ml soluție Tyrode acidă, la temperatura camerei, în plăci Petri de 35 mm. Se amestecă ușor, fără dispersarea embrionilor. Se observă continuu la stereomicroscop. În momentul în care zona pellucida este dizolvată (~1-2 minute) embrionii se vor lipi de vas. Imediat se umple vasul cu mediu M2 și se spală embrionii, pentru îndepărtarea soluției Tyrode acidă.
3. Îndepărtarea mediului de selecție din vasul cu fibroblaste producătoare de retrovirusuri și înlocuirea cu mediu MEM modificat alfa, cu 10% ser fetal de vițel și 10 $\mu\text{g/ml}$ Polybrene. *Polybrene este o moleculă încărcată pozitiv și ajută la creșterea vitezei de infectare. La doza respectivă nu este toxic pentru embrioni.* Culturile trebuie să fie subconfluente și încă în faza logaritmică de creștere pentru producerea maximă de virusuri.
4. Plasarea embrionilor fără zona pellucida în vasul de cultură, peste fibroblastele infectate cu vectori retrovirali și cultivarea 24 de ore, la 37°C. După incubare, embrionii ar trebui să fie în stadiul de morulă târzie - blastocist timpuriu.
5. Se scot embrionii din vasul de cultură și se transferă în uterul femelelor aflate în a doua zi jumătate de pseudogestație (vezi transferul uterin, capitolul 1, secțiunea VII). Mediul de cultură se filtrează și se îngheață la -20°C, pentru estimarea ulterioară a titrului viral. Pentru a obține un procent mare de infectare, titrul stocului viral trebuie să fie mare (5×10^5 sau mai mare). Procentul de nou-născuți ce conțin secvențe virale variază între 10-50%.
6. Se analizează rezultatele fie în cursul gestației, prin izolarea de țesuturi embrionare și extragerea de ADN sau ARN sau se analizează nou-născuții. Identificarea șoarecilor care poartă virusul se realizează prin extragerea ADN din coadă și analiza pe Southern blot. Prezența virusului în linia germinală poate fi analizată după încrucișarea cu un șoarece neinfestat.

III. MICROINJECTAREA TRANSGENEI ÎN NUCLEII SPERMATOZOIZILOR DE AMFIBIENI

Elucidarea bazei moleculare a diferențierii la amfibieni a fost mult timp împiedicată de lipsa unui sistem pentru exprimarea temporală și specifică de țesut a genelor embrionare. Injectarea ARN, cea mai folosită tehnică pentru exprimarea tranzitorie a unei gene la *Xenopus* a fost eficientă pentru studierea genelor maternale. Deoarece ARN este tradus imediat după injectare, metoda nu este favorabilă pentru studierea produșilor genelor zigotice, exprimate după tranziția la blastula mijocie. Injectarea directă de ADN poate fi folosită pentru exprimarea genelor după tranziția la blastula mijlocie utilizând regiuni promotor specifice temporal și spațial. Cu toate acestea, la amfibieni, metoda are două dezavantaje: (1) ADN injectat nu se integrează în cromozomi în timpul primelor cicluri de diviziune și astfel embrionul exprimă genele într-un model mozaicat; (2) multe regiuni promotor nu asigură o exprimare temporală și specifică de țesut atunci când ADN nu se integrează în genom. Pentru evitarea acestor probleme Kristen Kroll și Enrique Amaya au elaborat în 1996 o metodă de transgeneză bazată pe transplantul de nucleu. În această metodă ADN este integrat în nucleii spermatozoizilor, după care aceștia sunt transplantați în ovule nefecundate. Înaintea acestei metode s-au folosit pentru generarea de embrioni transgenici, nucleu de celule transfectate în cultură cu plasmide. Celulele cultivate, folosite pentru donarea de nucleu erau aneuploide și foarte rar permiteau dezvoltarea embrionilor pseudo-triploizi până în stadiul de mormoloc. Comparativ cu nucleii celulelor somatice, nucleii de spermatozoizi oferă următoarele avantaje: (1) nucleul spermatozoidului fiind haploid nu este necesară distrugerea nucleului ovocitar înaintea transplantului, pentru a genera un embrion diploid normal; (2) nucleii spermatozoizilor au fost folosiți mulți ani pentru a investiga numeroase procese, de tipul decondensării cromozomilor, asamblarea nucleară și controlul ciclului celular (Amaya și Kroll, 1999).

Transgeneza la *Xenopus* include următoarele etape de bază: (1) incubarea nucleilor spermatozoizilor cu ADN plasmidial liniarizat; (2) adăugarea extractului ovocitar interfazic la amestecul nucleu-plasmidă, împreună cu o cantitate mică de enzimă de restricție, folosită pentru liniarizarea plasmidei. Extractul decondensează parțial cromatina spermatozoizilor, însă nu inițiază replicarea; (3) diluarea amestecului de 50-100 ori; (4) transplantarea unui nucleu într-un ovul nefecundat (Fig. 66).

După transplantarea nucleilor spermatozoizilor, 20-40% din embrioni se divid și se dezvoltă normal. O singură persoană poate transplanta 500 de nucleu/oră, pentru a produce câteva sute, până la o mie de embrioni într-un experiment. 5-40% din embrionii segmentați se dezvoltă normal, dincolo de stadiul de mormoloc. Se obțin în general mormoloci de 1-2 luni, care sunt crescuți până în stadiul de adult.

Embrionii transgenici din stadiul de gastrulă și până în stadiul de mormoloc exprimă plasmidele fără mozaicism. Pentru exprimarea plasmidelor s-au folosit două tipuri de regiuni promotor: (1) regiuni promotor ubicue, de tipul celor din citomegalovirusul simian (CMV) și din actina citoscheletică (CSKA) de *X. borealis*. Regiunile promotor inițiază exprimarea genelor în toate celulele embrionilor transgenici. După realizarea hibridizării *in situ*, 20-50% din embrioni, exprimă în toate celulele, plasmide cu regiuni promotor CMV și CSKA. În schimb, embrionii injectați cu aceste plasmide exprimă genele raportoare doar în 5-20% din celule; (2) regiuni promotor ce direcționează exprimarea spațială a genelor. În acest caz s-au folosit plasmide ce conțin regiunea promotor a actinei specific musculară, asociată chloramfenicol acetiltransferazei (pRLCAR) sau proteinei fluorescente verzi

(pCARGFP). 40-60% din mormolocii transgenici prezintă o exprimare stabilă, nemozaică. Exprimarea este limitată la somite și țesutul miocardic.

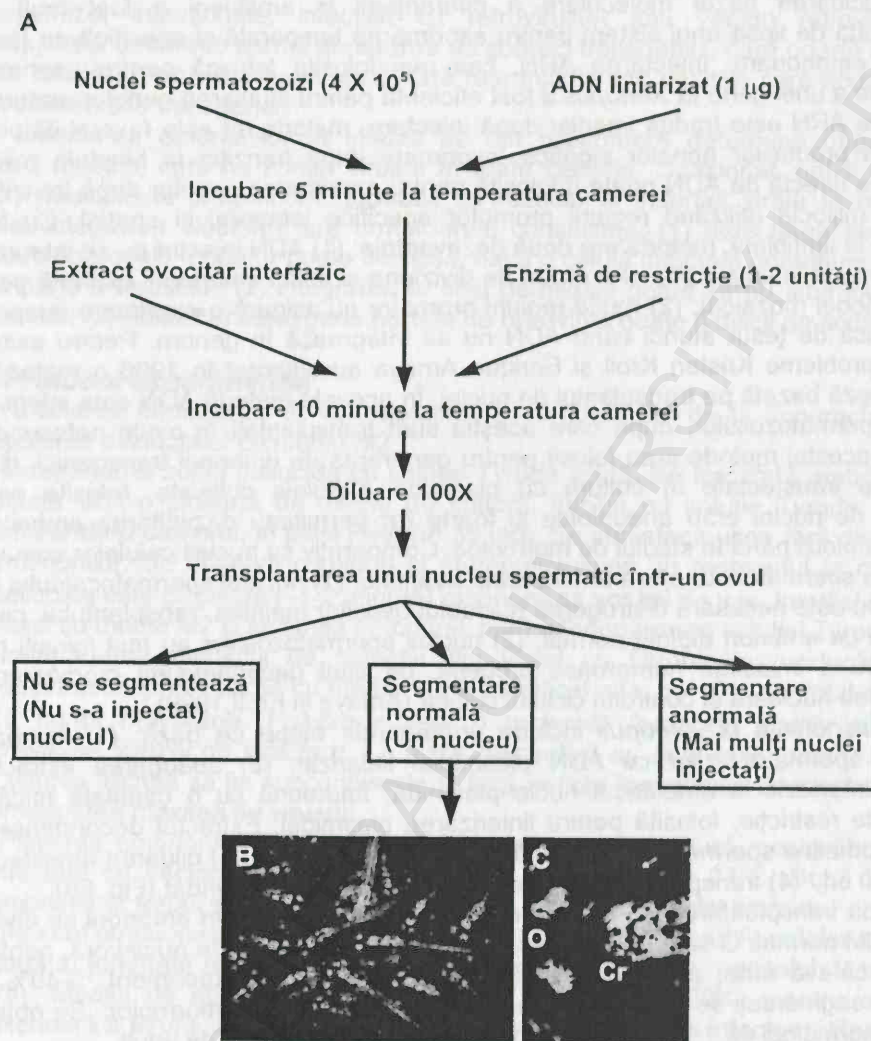


Fig.66. A-Reprezentarea schematică a transgenezei la amfibieni. B-Grup de larve transgenice *Pax-6/GFP* de *X. laevis* din a doua generație. C-Detaliu în care se remarcă exprimarea transgenei în creier (Cr) și placodele olfactive (O). (B și C după Hirsch și al.,2002).

Transplantarea și incubarea embrionilor după transplant nu se realizează la temperaturi mai mari de 22°C. Temperaturile mai mari (24-25°C) scad frecvența cu care sunt exprimate plasmidele. Acești embrioni himerici exprimă plasmidele într-un sfert sau jumătate din celule. Se presupune că la temperaturi de 24-25°C se accelerează prima diviziune de segmentare, aspect care nu permite integrarea plasmidelor introduse înaintea primei diviziuni.

Protocol experimental

Metoda este eficientă și include trei etape, fiecare în parte fiind critică pentru reușita transgenezei: (1) prepararea nucleilor de spermatozoizi; (2) obținerea extractului ovocitar interfazic; (3) transplantul nuclear. Se recomandă realizarea metodei pe etape. De exemplu, un începător trebuie să încerce inițial să izoleze nucleii de spermatozoizi și să îi transplanteze în ovule. Numai în momentul în care această operație este stăpânită și conduce la obținerea de embrioni normali, poate încerca să obțină embrioni după transplantarea nucleilor decondensați în extractul ovocitar. Dacă acești nuclei nu au efecte adverse asupra dezvoltării se poate adăuga enzima în reacție.

Prepararea nucleilor de spermatozoizi

1. Se anesteziază un mascul, într-un recipient, cu un litru de 0,1% Tricaine (MS222) și 0,1% bicarbonat de sodiu, cel puțin 20 minute (se poate folosi și metoda de introducere a animalului 20 minute, în apă cu gheață).
2. Se secționează ventral tegumentul și musculatura și se evidențiază corpul gras, care este îndepărtat, pentru izolarea celor două testicule, atașate la baza corpurilor grași, pe fiecare parte a liniei mediane.
3. Se secționează fiecare testicul și se plasează într-un vas Petri de 35 mm, ce conține soluție Ringer modificată de Marc, rece. Se spală de trei ori cu soluție Ringer modificată de Marc, rece și de două ori cu tampon nuclear. Se îndepărtează orice urmă de țesut gras. *În cursul acestei operații nu se înțeapă testiculul, deoarece se vor elibera spermatozoizii.*
4. Se transferă cele două testicule într-un vas Petri de 35 mm uscat și cu o pereche de pense fine se mărunțește bine țesutul (până nu se mai observă fragmente de țesut).
5. Se resuspendă țesutul testicular mărunțit în 2 ml tampon nuclear, prin pipetare ușoară cu o pipetă Pasteur cu diametrul vârfului de 3 mm.
6. Se stoarce suspensia celulară prin 2-4 bucăți de tifon, deasupra unei pălnii, așezate într-un tub de 15 ml. Se spală pensele și vasul Petri cu 8 ml tampon nuclear, care se strecoară prin tifon și se adaugă la tubul de 15 ml.
7. Centrifugarea suspensiei de spermatozoizi, la 1500g, 10 minute, la 4°C. Se resuspendă sedimentul în 8 ml tampon nuclear și se recentrifughează la 1500g, 10 minute, la 4°C.
8. Se resuspendă sedimentul într-un mililitru de tampon nuclear și se lasă să ia temperatura camerei. Se adaugă 50 μl de 10 mg/ml lizolecitină. Se amestecă ușor și se incubează 5 minute, la temperatura camerei.
9. Se adaugă 10 ml tampon nuclear rece cu 3% albumină serică bovină și inhibitori proteazici (1:1000 diluție a soluțiilor stoc de leupeptin⁴ și PMSF⁵). Se amestecă ușor prin inversarea tubului și se centrifughează la 1500g, 10 minute, la 4°C. Se îndepărtează supernatantul.
10. Se resuspendă sedimentul în 5 ml tampon nuclear rece, cu 0,3% albumină serică bovină, se amestecă ușor prin inversie și se recentrifughează la 1500g, 10 minute, la 4°C.
11. Se resuspendă sedimentul în 500 μl tampon de diluare spermatozoizi și se transferă suspensia într-un tub Eppendorf de 1,5 ml. Se numără spermatozoizii cu

⁴Inhibitor serin și cistein proteazic.

⁵Phenylmethylsulfonylfluoride, inhibitor serin proteazic.

un hemocitometru. În acest scop, se diluează 1:100 o cantitate mică din concentratul de spermatozoizi în tamponul de diluare și se adaugă 1 μ l de 1:100 soluție stoc Hoechst, pentru a vizualiza capetele spermatozoidelor în microscopia de fluorescență. *Colorantul fluorescent Hoechst se intercalează în ADN la nivelul adânciturilor minore și este selectiv pentru perechile de baze A-T.* Pentru o diluție de 1:100 se obțin în general $75-125 \times 10^4$ celule/ml. La această concentrație, soluția stoc nediluată conține 75-125 spermatozoizi/nl. Dacă se obține o soluție stoc mai puțin concentrată (de exemplu, mai puțin de 50×10^4 celule/ml la o diluție de 1:100) se recentrifughează suspensia de spermatozoizi și se resuspendă într-un volum mai mic de tampon de stocare spermatozoizi. Spermatozoizii pot fi stocați la 4°C și folosiți pentru transplantul nuclear în decurs de 48 de ore.

Obținerea extractului ovocitar

Principiul metodei constă în prepararea unui extract din fracția citosolică a unui ovul blocat în metafaza meiotică. Acest extract conține factorul citostatic (CSF⁶) (pentru detalii vezi Zarnescu O., Biologia moleculară a dezvoltării, partea a II-a). Adăugarea de calciu permite extractului să progreseze în interfază. Prin centrifugare la viteză mare se obține o fracție citoplasmatică mai pură. Folosirea centrifugatului și nu a extractului citoplasmatic crud este mai avantajoasă, deoarece centrifugatul induce umflarea nucleilor spermatozoidelor (și o oarecare decondensare a cromatinei) însă nu determină replicarea ADN. Replicarea ADN-ului spermatozoidelor incubati cu aceste extracte are loc după transplantarea nucleului în ovul. Centrifugatul poate fi stocat în porții mici la -80°C și dezghețat în momentul utilizării. Toate soluțiile ar trebui realizate înaintea preparării extractului, deoarece etapele sunt rapide.

1. Se injectează 8-12 femele adulte de *X. laevis* cu 25-100 U.I PMSG, în sacul limfatic dorsal și se lasă la temperatura camerei.
2. După 24 de ore se injectează fiecare broască cu 500-800 U.I HCG și se plasează câte două broaște într-un recipient, cu 2 litri de soluție Ringer modificată de Marc. *Separarea braștelor în perechi este necesară deoarece o singură broască cu ovule lizate sau activate poate compromite întregul extract.* Se plasează broaștele apoi la 15-18°C, peste noapte (12-14 ore).
3. În dimineața următoare se eliberează manual ovulele de la fiecare broască, într-un vas Petri mare, cu soluție Ringer modificată de Marc și se colectează cele nesparte și cu pigmentare uniformă. *Toate ovulele lizate, moarte sau marmorate, eliberate de o femelă sunt îndepărtate.* Volumul total de ovule trebuie să fie de 100 ml sau mai mare, înaintea îndepărtării învelișului gelatinos.
4. Se aspiră cât mai mult posibil din soluția Ringer modificată de Marc și se îndepărtează învelișul gelatinos cu 2% cisteină în tampon de extracție (fără HEPES/zaharoză). Se adaugă o cantitate mică, se rotesc ovulele și se înlocuiește parțial cu cisteină proaspătă de câteva ori în cursul tratamentului de îndepărtare a învelișului gelatinos. Se îndepărtează cu o pipetă ovulele sparte. *Îndepărtarea învelișului gelatinos se poate realiza separat pentru ovulele provenite de la femele diferite, astfel încât cele anormale sau activate să fie îndepărtate.*
5. Spălare de patru ori cu tampon de extracție cu HEPES/zaharoză (35 ml pentru fiecare spălare).
6. Spălarea ovulelor de două ori cu tampon de extracție – CSF, în prezență de inhibitori proteazici (25 ml pentru fiecare spălare).

⁶ Cytostatic factor

7. Cu o pipetă Pasteur cu vârful larg se transferă ovulele în tuburi de centrifugă Beckman (tuburi de 14 X 95 mm). Se îndepărtează cât de mult posibil din tamponul de extracție - CSF și se înlocuiește cu 1 ml de Versilube F-50.
8. Centrifugare 60 secunde, la temperatura camerei, la 150g (1000 rpm) și ulterior 30 secunde la 600g (2000 rpm). *După această centrifugare ovulele sunt compactate dar nespate. Versilube înlocuiește tamponul de extracție - CSF dintre ovule. Se observă un menisc inversat între Versilube și tamponul de extracție - CSF înlocuit. Se îndepărtează excesul de Versilube și tampon de extracție - CSF, după care se echilibrează tuburile.*
9. Centrifugare la 16.000g, 10 minute, la 2°C. După centrifugare, conținutul ovocitar este separat în trei straturi: (1) lipide, la suprafață; (2) citoplasmă, la centru; (3) vitelus, în sediment. Se colectează stratul citoplasmatic din fiecare tub cu o seringă cu ac de 18, prin inserarea lui la baza stratului citoplasmatic. Se transferă citoplasma într-un tub Beckman, pe gheață. *Dacă se folosesc volume mari de ovule intens pigmentate, stratul citoplasmatic poate fi gri (și nu auriu) după această etapă. Dacă se ultracentrifughează încă o dată extractul se clarifică și devine auriu.*
10. Se adaugă inhibitori proteazici pentru a izola citoplasma (nu se adaugă citochalasin); se recentrifughează pentru încă 10 minute la 16.000g. Se colectează citoplasma ca mai sus. Se poate obține 0,75 - 1 ml de citoplasmă de la o singură broască.
11. Se adaugă 1/20 volume de amestec „energetic” și se transferă citoplasma clarificată în tuburi Beckman cu pereți groși TL100.3. Tuburile sunt lăsate pe jumătate goale (2-3 ml de soluție în fiecare tub).
12. Se adaugă CaCl₂ la fiecare tub la o concentrație finală de 0,4 mM. *Acest tratament inactivează CSF și permite intrarea în interfază.* Se incubează 15 minute la temperatura camerei, după care se echilibrează tuburile pentru ultracentrifugare.
13. Se ultracentrifughează într-o ultracentrifugă Beckman TL-100 cu un rotor TL100.3, la 70.000 rpm, o oră și jumătate, la 4°C.
14. De la suprafață spre sediment citoplasma este fracționată în patru straturi: (1) lipide; (2) citosol; (3) membrane/mitocondrii; (4) glicogen/ribozomi. Se îndepărtează stratul citosolic din fiecare tub (~1 ml) prin inserarea unei seringi prin stratul lipidic. Se transferă fracția citosolică în tuburi TL-100 și se centrifughează din nou la 70.000 rpm, 20 minute, la 4°C.
15. Se porționează supernatantul în volume de 25 μl, în tuburi Eppendorf de 0,5 ml. Se congelează în azot lichid și se stochează la -80°C, până în momentul folosirii. Pentru a testa eficiența extractului, nucleii de spermatozoizi sunt incubati cu un volum de extract și colorați cu Hoechst. Dacă extractul este eficient, în 10 minute de la adăugarea extractului, se poate observa la microscop umflarea nucleilor (se îngroașă și se alungesc).

Transplantarea nucleilor

1. Se injectează 2-4 femele adulte, cu 500-800 U.I HCG, în sacul limfatic dorsal și se incubează la 15°C, 12-16 ore înaintea transplantului.
2. Se pregătesc micromanipulatoarele pentru injectare (pentru detaliile tehnice ale injectorului vezi Amaya și Kroll, 1999).
3. Se umple un vas Petri tapetat cu agaroză cu 0,4X soluție Ringer modificată de Marc + 6% Ficoll.

4. Se pregătește soluția de injectare (soluție stoc spermatozoizi diluată ~1:10): 4 μ l soluție stoc spermatozoizi ($\sim 4 \times 10^5$ nuclei) și 5 μ l plasmidă liniarizată (150-250 ng/ μ l). Incubare 5 minute.
5. Se adaugă 0,5 μ l dintr-o soluție diluată 1:5 ce conține *Xba*I sau *Not*I, 2 μ l 100 mM $MgCl_2$ și 25 μ l extract ovocitar. Se amestecă prin pipetare ușoară și se incubează 10 minute, la temperatura camerei. *Dacă în această etapă spermatozoizii sunt diluați, colorați cu Hoechst și analizați la microscopul de fluorescență cu obiectivul de 10X sau 20X se poate observa clar umflarea lor.*
6. În timp ce nucleii spermatici se umflă, se colectează ovule și se îndepărtează învelișul gelatinos cu 2,5% cisteină în soluție Ringer modificată de Marc (pH 8 cu NaOH).
7. Se analizează la stereomicroscop ovulele și se rețin numai cele sănătoase (pigmentate uniform și care rămân rotunde după îndepărtarea învelișului gelatinos).
8. Se diluează spermatozoizii 1:25 - 1:100 în tampon de diluție pentru spermatozoizi (astfel încât diluția finală să fie de 1:250 - 1:1000; aceasta corespunde unei concentrații de 1-2 spermatozoizi/10-15 nl de volum de injectare). Pentru anumite enzime, de tipul *Not*I sau *Xba*I se adaugă 5 mM $MgCl_2$. *Înainte de îndepărtarea spermatozoizilor din tubul stoc sau din diluțiile folosite pentru injectare, întotdeauna se amestecă cu vârful unei micropipete, deoarece nucleii sedimentează rapid din suspensie.*
9. Transplantarea nucleilor. Se injectează ~10 nl de soluție diluată 1:500 - 1:1000, ce corespunde la ~un nucleu. Acul de injectare se introduce rapid, perpendicular pe suprafața membranei. Orificiul realizat în ou poate rămâne vizibil 5 secunde. Dacă vârful acului este prea subțire sau este parțial înfundat, nucleii injectați sunt alterați. În acest caz rezultă embrioni haploizi. Mormolocii haploizi au corpuri și cozi mai scurte, fiind mai groși decât normal. Adesea au capete și cozi curbate către fața dorsală. Deși acești mormoloci pot supraviețui un timp, mor în momentul în care încep hrănirea. Injectarea corectă poate fi indicată de prima diviziune de segmentare a ovulelor transgenice. Dacă ovulul a primit un nucleu spermatic, frecvența segmentării va fi scăzută. Dacă se injectează un volum prea mare, ovulele nu suferă segmentarea; în acest caz emisfera animală pigmentată apare marmorată. Ovulele injectate cu mai mulți nuclei formează după prima diviziune de segmentare, 3-4 sau mai multe celule. Mulți din acești embrioni se dezvoltă până în stadiul de blastulă, dar majoritatea mor în cursul gastrulării. În alți embrioni, anumite regiuni nu se celularizează și aceștia mor. Ovulele injectate cu mai mulți nuclei care suferă gastrularea o fac de obicei anormal. Blastoporul nu se închide normal și determină formarea de embrioni care au două „aripi” de somite și țesut neural pe fiecare parte a țesutului vitelin, dispus în centrul embrionului.
10. În momentul în care embrionii transgenici au atins stadiul de 4-16 blastomere, se separă cu grijă de cei anormali și se transferă cu o pipetă Pasteur într-un vas Petri cu 0,1X soluție Ringer modificată de Marc + 6% Ficoll + 50 μ g/ml gentamicină. Se recomandă cultivarea embrionilor în plăci de cultură cu 6 sau 12 godeuri, cu 10 embrioni/godeu. *Cultivarea embrionilor la densitate mare poate compromite supraviețuirea. Este de asemenea importantă îndepărtarea periodică a embrionilor morți, pentru că ei îi pot afecta pe cei sănătoși.*
11. Când embrionii sunt în jurul stadiului 12 se înlocuiește mediul cu 0,1X soluție Ringer modificată de Marc + 50 μ g/ml gentamicină, fără Ficoll. *Datorită diametrului mare al vârfului pipetei de injectare, embrionii formează adesea excrescențe la locul*

de injecție. Aceste excrescențe se formează după injectare, când citoplasma este forțată să iasă prin orificiul rămas în anvelopa vitelină. Ele nu afectează în general dezvoltarea. Excrescențele dispar în stadiul de neurulă, dar pot fi îndepărtate și manual după stadiul de blastulă.

IV. MICROINJECTAREA ADN ÎN PRONUCLEII OVULELOR FECUNDATE DE ȘOARECE

Această metodă determină o integrare cromozomială stabilă a ADN străin în 10-40% din șoarecii transgenici rezultați. În majoritatea cazurilor, integrarea apare a avea loc în stadiul de zigot, deoarece transgena este prezentă în toate celulele animalului transgenic, inclusiv în celulele germinale primordiale. 20-30% din șoarecii transgenici sunt mozaic sau himere, deoarece ADN străin se integrează mai târziu. Numărul de copii de ADN străin integrate diferă de la una la câteva sute și nu depinde de numărul de molecule de ADN injectate. Transgena se integrează întâmplător în autozomi sau heterozomi. Când sunt prezente mai multe copii, ele se găsesc de obicei la un singur locus cromozomial. Ocazional, pot exista situsuri de integrare separate, pe doi cromozomi diferiți. Copiile de ADN străin de la fiecare situs de integrare sunt aranjate în principal într-un model cap-coadă, deși unele evenimente de integrare pot fi mai complicate. Odată încorporată în ADN, transgena se transmite într-o manieră Mendeliană.

Moleculele de ADN izolate în cantități suficiente și cu un grad mare de puritate pot fi inserate în genomul de șoarece prin microinjectare în zigot. Deși frecvența integrărilor obținute cu diferite fragmente de ADN sau construcții poate varia în condiții de lucru asemănătoare, nu există dovezi că secvența ADN sau compoziția în baze azotate are efect asupra integrării. În plus, deși transgenele foarte mari (>30 kb) pot fi mai dificil de izolat sau construit, lungimea constructului ADN injectat nu apare a fi un factor limitant pentru obținerea șoarecilor transgenici.

O transgenă este exprimată într-un model spațial și temporal, dependent de elementele pe care le conține. Poziția cromozomială a transgenei poate afecta exprimarea, prin blocarea transcripțională sau activarea ectopică. Structura transgenei depinde de scopul experimentului. O transgenă ar trebui să funcționeze ca oricare altă genă din celula țintă. Din acest motiv, elementele structurale trebuie să fie recunoscute corespunzător de aparatul transcripțional, post-transcripțional și translațional al celulei gazdă. Fragmentele de ADN microinjectate conțin de obicei secvențe raportor heteroloage sau gene a căror exprimare poate fi detectată (Si-Hoe și al., 2001).

Această metodă a permis realizarea a numeroase studii embrionare prin producerea de embrioni și adulți transformați. Transformarea prin intermediul construcțiilor GFP a condus la generarea de embrioni sau adulți fluorescenți la șoarece (Fig. 67, pentru varianta color a figurilor 67E-F vezi Planșa I3-I4), maimuță, porc, vacă, *D. rerio*, *Xenopus*, ascidii, arici de mare *Drosophila*, viermele de mătase și *C. elegans* (Yu și al., 2003). Se folosesc trei variante mutante de GFP: (1) EGFP⁷, cu doi aminoacizi substituiți. Are o fluorescență de 30-40 de ori mai intensă decât GFP; (2) EYFP⁸, cu patru aminoacizi substituiți, ce determină o fluorescență galben-verzuie; (3)

⁷Enhanced GFP, GFP intensificată, engl.

⁸Enhanced Yellow Fluorescent Protein, proteină fluorescentă galbenă intensificată.

ECFP⁹, conține șase aminoacizi substituiți și emite o fluorescență albastră (Hadjantonakis și Nagy,2001). În acest scop, se injectează în pronuclei ADN plasmidial ce conține gena *gfp*, împreună cu enzime de restricție. Acest tip de transformare determină frecvent apariția unei formațiuni extracromozomiale mari, datorate probabil recombinării omoloage. Formațiunile extracromozomiale segregă în cursul mitozei și meiozei și sunt moștenite de generațiile ulterioare împreună cu *gfp*, chiar dacă nu se integrează în cromozomi.

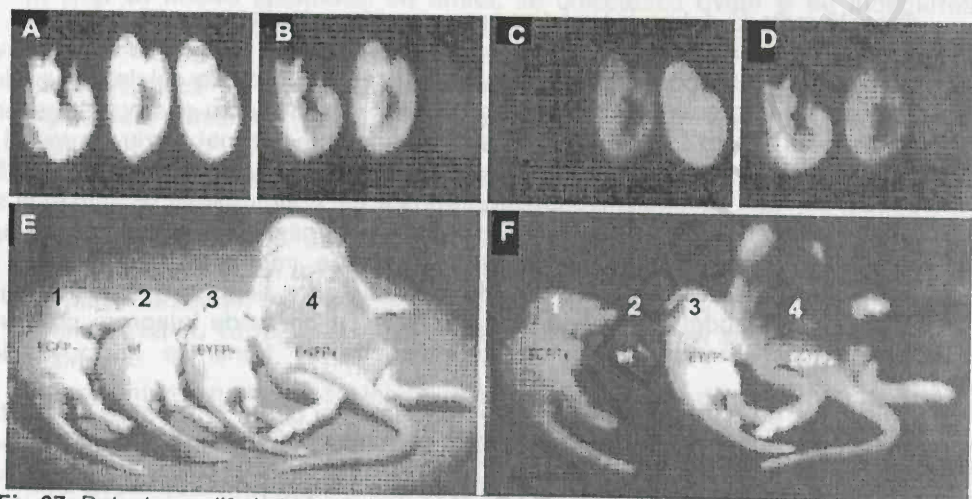


Fig.67. Detectarea diferitelor variante de GFP în embrionii și adulții de șoarece. A-Embrioni transgenici de 9 zile jumătate observați la microscopul cu câmp luminos. Aceeași embrioni observați la microscopul de fluorescență, cu filtru pentru EGFP (B), ECFP (C) și EYFP (D). E-Nou-născuți transgenici (1, 3, 4) și normali (2), observați la microscopul cu câmp luminos. F-Aceeași șoareci observați cu filtre corespunzătoare pentru diferite forme de GFP. Fiecare șoarece a fost fotografiat separat cu filtrul corespunzător, după care imaginile au fost asamblate într-o singură figură. (După Hadjantonakis și Nagy,2001).

Generarea unui animal transgenic este un proces de lungă durată, cea mai mare parte a timpului fiind necesară pentru construirea transgenei. Se poate constata că după ce au fost obținute suficiente animale transgenice pentru analize, transgena trebuie reconstruită. Au fost elaborate câteva principii care stau la baza construcției transgenei.

⇒ Prezența unor secvențe de ADN procariot derivate din vector, în apropierea fragmentului de ADN microinjectat poate împiedica sever exprimarea unor transgene eucariote. Secvențele codificatoare bacteriene de tipul cloramfenicol acetiltransferazei (CAT) și β -galactozidazei sunt adesea încorporate în transgene ca raportori. Spre deosebire de unele secvențe ale vectorilor, acestea nu inhibă exprimarea genelor eucariote. Se presupune că efectul inhibitor al unor secvențe de ADN procariot este specific secvențelor conținute în vectorii λ și cei derivați din fagi. Ca o regulă generală, înaintea injectării ADN clonat se îndepărtează toate secvențele vectorului.

⁹Enhanced Cyan Fluorescent Protein, proteină fluorescentă albastră intensificată.

- ⇒ Pentru majoritatea experimentelor transgenice se dorește o exprimare dependentă de țesut sau stadiu embrionar. Deoarece elementele ADN care conferă aceste specificități sunt adesea necunoscute, este bine să se includă cât mai mult din gena respectivă. Se recomandă introducerea intronilor, a regiunii 3'UTR și a secvențelor localizate înaintea genei, deoarece elementele reglatoare pot fi localizate în aceste regiuni. Genele adiacente pot conține secvențe ce determină exprimarea corectă a genelor vecine, cum este cazul ocitocinei și vasopresinei. Regiunile LCR¹⁰ permit exprimarea transgenei independent de poziție și dependentă de numărul de copii, însă au fost identificate pentru un număr foarte mic de gene. În plus, sunt plasate la distanțe foarte lungi de regiunea codificatoare.
- ⇒ Genele raportoare ar trebui localizate în primul sau ultimul exon. Inserția într-un exon intern poate altera eficiența procesării alternative a transcriptului primar.
- ⇒ Folosirea unei transgene mozaic, prin combinarea de fragmente ADN din diferite gene poate determina exprimări ectopice imprevizibile. Din acest motiv este bine ca transgena să fie simplă și să conțină doar elementele reglatoare ale unei gene.
- ⇒ Exprimarea transgenelor într-un anumit tip celular depinde de câțiva factori. Regiunile promotor proximale ale genelor transcrise de ARN polimeraza II, conțin o secvență consens (TATA box) în jur de 30 pb, înaintea situsului de inițiere a transcripției. Această secvență este necesară pentru legarea și activarea aparatului transcripțional bazal, ce include proteinele de legare la secvența TATA (TBP¹¹), un proces care este intensificat de către factorii transcripționali generali și reglatori. Inițierea transcripțională are loc apoi prin legarea factorilor transcripționali activatori, înaintea recrutării factorilor transcripționali generali și a ARN polimerazei II, pentru a forma un complex de preinițiere, necesar pentru activarea transcripțională. Secvența de evenimente, deși esențială pentru exprimarea transgenei, conferă doar transcrierea la un nivel bazal.
- ⇒ Elementele enhancer și silencer sunt secvențe genice specifice, recunoscute de factorii transcripționali și localizate înaintea regiunii codificatoare. Activarea sau represia transcripției și nivelul la care are loc aceasta într-un anumit tip celular depinde de tipul de factori transcripționali prezenți în celula respectivă. Legarea factorilor transcripționali la elementele enhancer sau silencer se presupune că are loc prin proteine mediator. Aceste secvențe au fost descoperite în regiunile 5' ale genelor, în regiunile codificatoare 3' și în introni. Includerea acestor elemente într-un construct transgenic este esențială pentru exprimarea specific celulară. Exprimarea transgenei este adesea ectopică. Acest comportament poate fi datorat absenței elementelor silencer în regiunile flancatoare ale transgenei, care ar bloca în mod normal exprimarea genei endogene în acel tip celular sau prezența unei regiuni enhancer specifică de țesut în ADN cromozomial endogen, la situsul integrării. Lipsa exprimării transgenei poate fi datorată absenței secvențelor enhancer specifice în transgenă sau prezența unui element silencer la situsul integrării transgenei. Exprimarea necorespunzătoare a transgenei poate fi rezultatul interacției elementelor reglatorii dintr-o genă raportoare cu cele din secvențele flancatoare.
- ⇒ La capătul unui transcript, există secvențe esențiale pentru terminarea transcripției și procesarea capătului 3' a ARNm. Acestea includ semnalul de poliadenilare, care direcționează sinteza cozii poli (A) de la capătul 3' al ARNm. Într-un construct

¹⁰Locus Control Region

¹¹TATA Binding Protein

transgenic aceste secvențe pot fi prezente fie ca parte a unei gene raportoare sau în cazul transgenei ADNc sub forma unei casete 3' suplimentare.

Eficiența transferului genic depinde de următoarele aspecte:

⇒ ADN liniar sau circular

S-au produs șoareci transgenici prin microinjectarea atât a moleculelor liniare cât și a celor superrăsucite de ADN. Moleculele de ADN liniare se integrează de cinci ori mai frecvent decât cele superrăsucite. Formele liniare sau circulare se integrează cel mai frecvent în copii multiple, într-un model cap-coadă. Acest tip de integrare se presupune că are loc prin circularizarea rapidă a moleculelor liniare, după injectare în pronucleu, urmată de recombinația omoloagă între moleculele circulare și integrarea în genom. Structura capetelor unei molecule liniare are un efect minor asupra frecvenței integrării sau structurii moleculelor integrate.

⇒ Concentrația ADN

Este dificil, dacă nu imposibil de a controla acuratețea volumului de soluție ADN introdus în pronucleu. Majoritatea cercetătorilor introduc 1-2 picolitri, însă fracția de ADN rămasă în nucleu este necunoscută. Singura variabilă care poate fi controlată este concentrația soluției de ADN injectat. O integrare eficientă (20-40%) este realizată cu 1 $\mu\text{g/ml}$ ADN liniar. La concentrații mari de ADN ($>10 \mu\text{g/ml}$) este afectată supraviețuirea embrionului. Numărul optim de șoareci transgenici se obține când se injectează o concentrație de 1-2 $\mu\text{g/ml}$ ADN, ce corespunde la 200-400 molecule ADN de 5 kb/picolitru. Din păcate nu există nici o corelație între concentrația ADN injectat și numărul de copii integrate. Prin injectarea unei concentrații scăzute de ADN (20 molecule/picolitru) s-au generat șoareci transgenici, majoritatea (5 din 7) purtând o singură copie a moleculei de ADN injectate.

⇒ Tamponul de solubilizare a ADN

Tamponul de injectare conține 5-10 mM Tris (pH 7,4) și 0,1-0,25 mM EDTA. Adăugarea de 1mM EDTA sau 1 mM MgCl_2 îmbunătățește supraviețuirea embrionară cu 30-50%. Concentrațiile mari de EDTA (5 mM) sau MgCl_2 (3 mM) sunt extrem de toxice. În schimb, lipsa EDTA din tamponul de solubilizare reduce eficiența de integrare și numărul de embrioni ce supraviețuiesc.

⇒ Puritatea ADN

Probele de ADN microinjectate trebuie să fie fără contaminanți (urme de fenol, etanol sau enzime) ce pot afecta zigotul. În plus, pentru îndepărtarea materiei particulare, ce ar putea înfunda acul de injectare este esențială filtrarea tuturor soluțiilor adăugate la proba de ADN, prin filtru de 0,2 μm .

⇒ Momentul injectării

Pronucleii ovulelor fecundate pot fi injectați mai ușor când au dimensiunea maximă, însă înaintea dispariției membranei nucleare, care are loc înaintea primei diviziuni de segmentare. Pronucleii se umflă progresiv în stadiul de zigot și rămân în stadiul optim pentru injectare 3-5 ore. Momentul exact al zilei când ovulele sunt apte de injectare depinde de momentul administrării gonadotropinei corionice și într-o oarecare măsură de linia de șoareci utilizată. Astfel, dacă gonadotropina corionică umană este administrată la ora 12 ziua, ovulele pot fi injectate între 12 a.m și 6 p.m, următoarea zi. Cel mai bun moment pentru injectare este determinat empiric. Un transfer genic reușit nu depinde de injectarea într-un anumit moment al ciclului celular.

Microinjectarea pronucleilor se realizează la o mărire de 400-500X, cu un obiectiv de 40X și un ocular de 10-12,5X. Obiectivele de 4-10X sunt folosite pentru mișcarea ovulelor în jurul camerei de injectare și pentru transferul lor în și afară din camera de injectare.

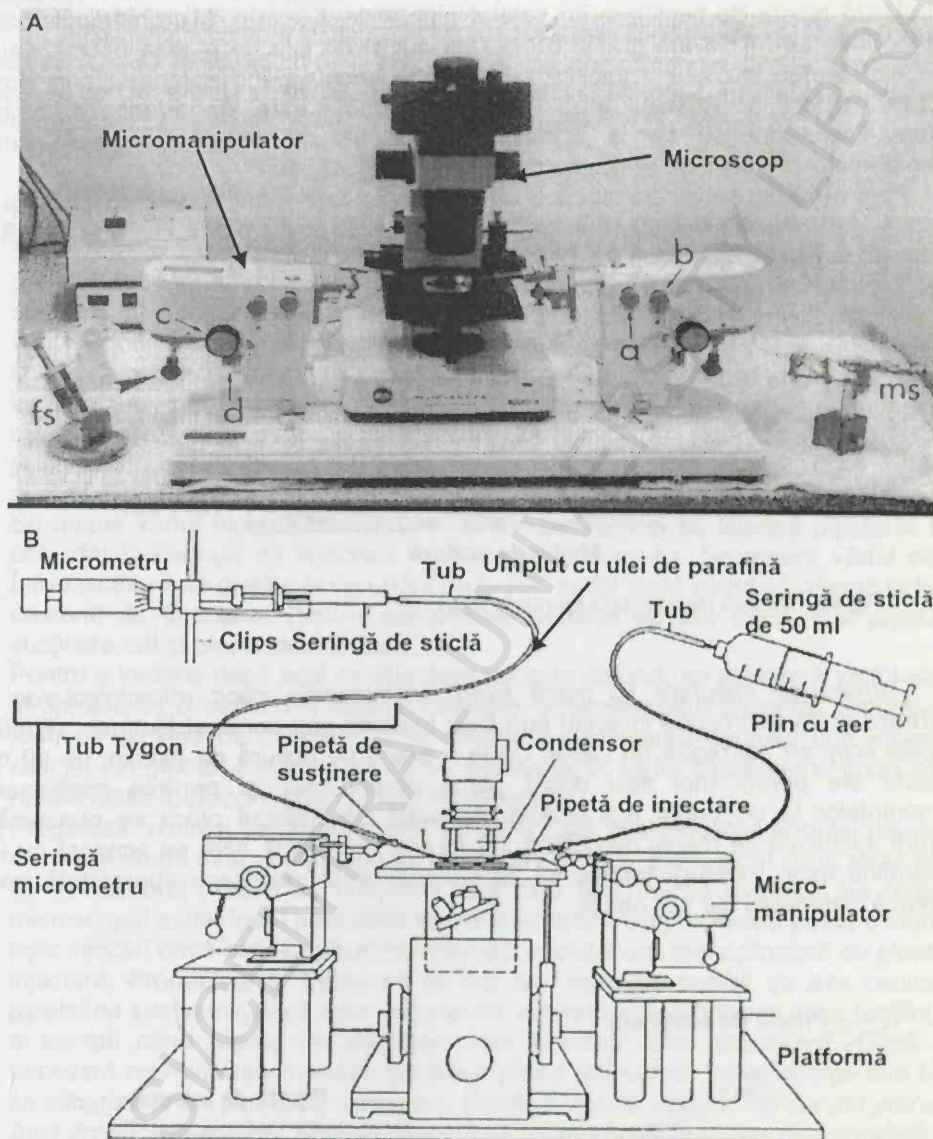


Fig.68. A-Ansamblu format din micromanipulatoare și microscop. a-b-butoane pentru deplasarea manipuloarelor în plan orizontal. c-buton prin care se ajustează unghiul de înclinare al micromanipulatorului. d-buton de ajustare a poziției micromanipulatorului în plan vertical. Joystik-ul permite deplasarea în plan orizontal (cap de săgeată), ms-siringă micrometru. Fs-siringă Fonbrune. B-Schema aranjării micromanipuloarelor pentru injectarea ADN în pronuclei.

Operația de injectare se realizează cu ajutorul micromanipulatoarelor (Fig.68). Pentru micromanipularea ovulelor de șoarece se folosește **micromanipulatorul Leitz**. O adaptare importantă a acestui tip de micromanipulator este prezența unui "joystick", ce permite mișcarea simultană în două dimensiuni. Se montează câte un micromanipulator pe fiecare parte a platinei microscopului, un micromanipulator controlează pipeta de susținere iar celălalt pipeta de injectare. Micromanipulatoarele sunt montate ferm la o înălțime și o distanță adecvate față de platina microscopului. Manipulatoarele Leitz pot fi folosite cu anumite microscopie inversate prin simpla montare a lor la aceeași bază cu microscopul. Este important ca ambele micromanipulatoare să fie la același nivel și să nu se deplaseze în timpul experimentelor. Fixarea se realizează cu șuruburi sau magneți.

Pentru introducerea transgenei, ovulele fecundate sunt plasate în camera de injectare. Se folosesc trei tipuri de camere de injectare: (1) placă Petri; (2) lamă cu godeu; (3) lamă de microscop.

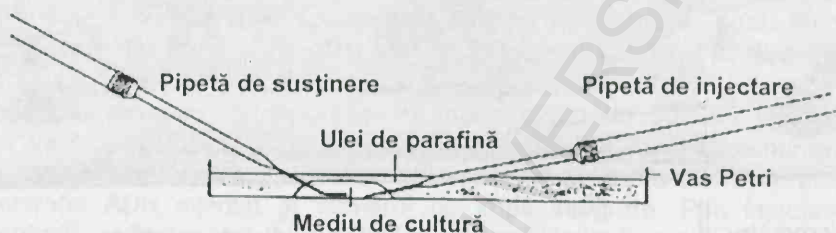


Fig.69. Cameră de injectare tip placă Petri.

Camera de injectare tip placă Petri se folosește când microinjectarea se realizează la un microscop inversat cu câmp luminos sau contrast Hoffman (Fig.69). În acest scop se utilizează un capac de la o placă de cultură de plastic, de 90 mm (capacul are pereții mai mici decât placa propriu-zisă, și permite poziționarea instrumentelor la un unghi mai redus). Aproape de mijlocul plăcii se plasează o picătură aplatizată de mediu de cultură M2 (5 mm diametru), care se acoperă cu ulei de parafină ușor. Picătura trebuie să fie cât mai plată, deoarece suprafețele curbe cauzează distorsiuni ale căii optice.

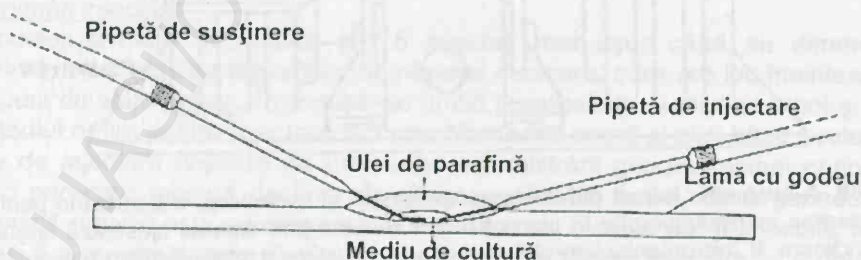


Fig.70. Cameră de injectare tip lamă cu godeu.

Camera de injectare tip lamă cu godeu este folosită la microscopul inversat, în orice tip de sistem optic (Fig.70). Godeul este ușor siliconizat. Se spală lama cu apă distilată și alcool 70%, după care se usucă. Se plasează o picătură aplatizată de mediu M2 în centrul godeului și se acoperă cu ulei de parafină ușor. Dacă lama nu este siliconizată suficient, picătura se va deplasa când sunt introduse instrumentele de injectare.

Camera de injectare tip lamă plată se folosește în general când injectarea se realizează la microscopul cu contrast de fază Nomarski. Deși se lucrează mai dificil cu acest tip de cameră de injectare, adesea rezultatele obținute sunt mai bune, deoarece se elimină din calea optică una din suprafețele curbe.

Protocol experimental

1. Se assemblează camera de injectare și se plasează la microscop.
2. Se focalizează picătura de mediu de cultură și se introduce pipeta de susținere, prin partea stângă, în picătura de mediu de cultură. Se poziționează astfel încât să stea orizontal pe fundul camerei de injectare.
3. Cu pipeta de transfer se plasează câteva ovule de șoarece în camera de injectare. Ovulele sunt examinate la mărire mare, pentru identificarea pronucleilor. Pronucleii nu se observă în următoarele situații: (1) ovulele nu sunt fecundate și în acest caz nu este prezent al doilea globul polar; (2) ovulele au fost fecundate recent și pronucleii nu s-au format; (3) pronucleii au fuzionat deja și zigotul se va divide curând. După identificarea pronucleilor se comută microscopul pe obiectiv mic.
4. Se umple vârful pipetei de injectare cu soluția ADN și se fixează pipeta în tubul conectat la seringă de injectare a micromanipulatorului. Se inseră vârful pipetei într-o picătură de mediu, la un unghi de $5-10^\circ$, astfel încât vârful să ajungă la fundul camerei de injectare. Pentru deplasarea ovulelor se pot folosi atât pipeta de susținere cât și pipeta de injectare.
5. Pentru a verifica dacă acul de injectare nu este obturat, se plasează vârful pipetei în apropierea ovulului (dar fără să-l atingă), în același plan orizontal. Se presează ferm pe seringă de injectare și se încearcă deplasarea ovulului prin eliberarea soluției din pipetă. Dacă ovulul nu se deplasează, vârful pipetei este înfundat. Se repetă testul folosind o nouă pipetă de injectare.
6. Pregătirea ovulului pentru injectare se realizează prin plasarea vârfului pipetei de susținere lângă ovul și aspirarea lui la capătul pipetei, astfel încât zona pellucida să fie în interiorul pipetei de susținere, dar fără deformarea ovulului. Se reglează microscopul astfel încât pronucleii să devină vizibili. Un pronucleu poate fi mult mai ușor injectat dacă este localizat în regiunea ovulului cea mai apropiată de pipeta de injectare. Pronucleul ar trebui să fie cât mai aproape posibil de axa centrală a pipetei de susținere; dacă este departe de această axă, ovulul va avea tendința de a se roti când pipeta de injectare este împinsă către pronucleu. Dacă este necesară reorientarea ovulului, pentru a plasa pronucleul într-o poziție mai bună, se eliberează din pipeta de susținere. *Poate fi injectat oricare din cei doi pronuclei, însă pronucleul mascul fiind de obicei mai mare și mai aproape de suprafață este mai ușor de "nimerit".*
7. Pentru injectare se focalizează pronucleul. Se plasează vârful pipetei de injectare lângă ovul și se aduce în același plan focal, folosind controlul vertical al micromanipulatorului. Înaintea injectării se presează ferm pe seringă pentru a scoate mediul de cultură, care a putut intra în vârful acului de injectare. Se împinge foarte încet pipeta de injectare prin zona pellucida către pronucleu. Se evită atingerea nucleolilor, care sunt foarte lipicioși și vor adera de pipetă. Când vârful

pipetei apare a fi înăuntrul pronucleului, se apasă pe seringă. *Injectarea este reușită numai dacă pronucleul se umflă* (Fig.71A).

8. Se scoate rapid pipeta din ovul. Dacă pipeta este scoasă încet va rămâne atașată de componente nucleare (probabil membrana nucleară sau cromozomi) și va trage după ea pronucleul. Dacă pronucleul nu se umflă, pipeta s-a înfundat sau nu a perforat oolema. Când seringă de injectare nu a penetrat membrana plasmatică (Fig.71B) se formează o "bulă" mică, rotundă în jurul vârfului. Oolema este foarte elastică și poate fi împinsă în ovul și chiar în pronucleu fără a fi penetrată.

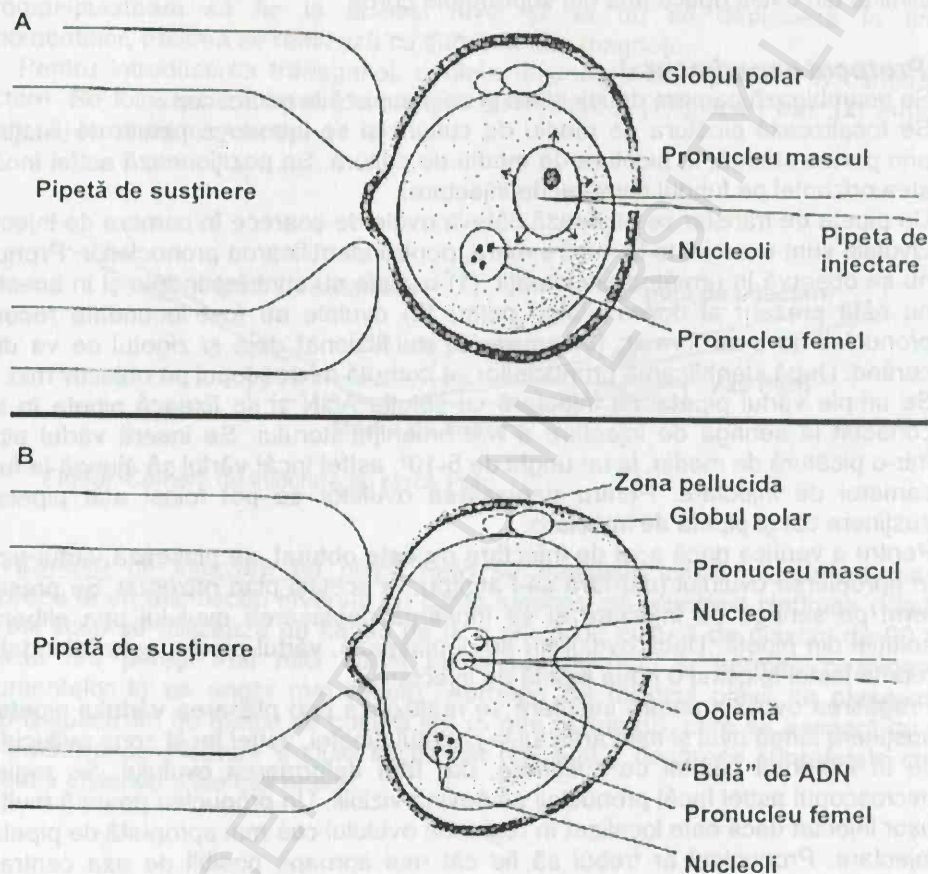


Fig.71. A-Injectarea corectă a ADN în pronucleu. B-Penetrarea incompletă a oolemei.

9. Dacă după îndepărtarea pipetei de injectare sunt eliminate granule citoplasmatică, operația a condus la lezarea ovulului. Se repetă injectarea cu alt ovul. Dacă ovulul apare intact se comută microscopul pe obiectiv mai mic și se plasează la un capăt al picăturii de mediu de cultură. Se repetă protocolul cu alt ovul. Se folosește aceeași pipetă de injectare atâta timp cât injectarea este reușită. De regulă o pipetă de injectare poate fi folosită pentru 5-10 ovule. Când toate ovulele din cameră au fost injectate, se pun înapoi în mediul de cultură și se incubează la

- 37°C. Se transferă alte ovule în camera de injectare, însă doar atâtea câte pot fi injectate în 15 minute, deoarece ovulele pot fi alterate dacă sunt lăsate prea mult la temperatura camerei.
10. În momentul în care toate ovulele au fost injectate, se sortează și se separă la stereomicroscop, cele care au aspect normal de cele lezate. *Un ovul normal are un contur distinct și un spațiu perivitelin între oolemă și zona pellucida. În ovulele alterate nu este prezent spațiul perivitelin.* În condiții optime, 60-80% din ovule supraviețuiesc injectării.
11. Ovulele fecundate microinjectate sunt transferate în următoarele variante (vezi capitolul 1, subcapitolul *Mus musculus*, secțiunea VII);
- Transfer în aceeași zi cu injectarea, în oviductul femelelor aflate la 12 ore de pseudogestație;
 - Cutivare *in vitro* până în stadiul de două celule (peste noapte) și transfer în oviductul femelelor aflate la 12 ore de pseudogestație;
 - Cutivare *in vitro* până în stadiul de blastocist și transfer în uterul femelelor pseudogestante de două zile jumătate.
- Primele două variante furnizează cel mai mare procent de supraviețuire la termen, pentru că evită cultura prelungită *in vitro*.
- Aproximativ 10-30% din ovulele microinjectate în oviduct se vor dezvolta la termen. Se transferă 20-30 ovule microinjectate în fiecare femelă purtătoare pseudogestantă. În majoritatea cazurilor, toți embrionii pot fi transferați într-un oviduct. Dacă embrionii sunt recoltați la stadii timpurii (8 zile jumătate – 10 zile jumătate post-împerechere) se transferă jumătate din embrioni în fiecare din cele două oviducte.
12. Șoarecii transgenici potențiali (șoarecii născuți din ovule fecundate microinjectate sau embrioni infectați cu vectori retrovirali) pot fi identificați inițial prin PCR și/sau digestia cu enzime de restricție și analiza Southern blot. Analiza PCR este rapidă și ușoară, dar poate da artefacte de tipul contaminării ADN din coadă cu ADN plasmidial. Pentru analiza PCR este necesară alegerea și sinteza a doi primeri, care vor amplifica o bandă specifică de 200-400 perechi de baze din transgenă. Pentru a estima numărul de copii transgenice integrate este necesară determinarea concentrației ADN genomic de la șoarece. Multe preparate ADN ca cele purificate din coadă pot fi contaminate intens cu ARN. Astfel, absorbanta UV a probei la 260 nm nu va reflecta concentrația de ADN și va trebui realizată o determinare fluorimetrică a ADN.
- O estimare a numărului de copii transgenice poate fi obținută prin includerea cantităților standard de transgenă injectată, fiecare amestecată cu 5-10 μg de ADN de șoarece, în benzi paralele pe un Southern blot.
- Se folosesc cozi de la șoareci de 3 săptămâni. Se obține 50-100 mg de ADN de greutate moleculară mare, din 1-1,5 cm coadă de șoarece de 2-3 săptămâni. Acesta poate fi digerat cu enzime de restricție și supus Southern blot sau PCR. Pentru identificarea embrionilor transgenici prin Southern blot, ADN se izolează din sacul vitelin al embrionilor de nouă zile jumătate sau mai avansați.
- Pe parcursul protocolului de microinjectare pot apărea următoarele probleme:
- ⇒ Prea puține femele gestante: (a) masculi prea tineri sau prea bătrâni; (b) ciclul z-lumină prea lung sau prea scurt; (c) lot necorespunzător de hormoni pentru inducerea superovulației; (d) masculi împerecheați prea des;
- ⇒ Număr mic de ovule: (a) lot necorespunzător de hormoni pentru inducerea superovulației; (b) femele prea bătrâne;

- ⇒ Putine ovule cu doi pronuclei: (a) masculii prea bătrâni sau suprasolicitați; (b) ovulele nu au fost fecundate în momentul recoltării; În acest caz se verifică schema de injectare hormonală sau se recoltează mai târziu în cursul zilei; (c) femele prea tinere; (d) microscopul nefocalizat corespunzător sau alte probleme optice.
- ⇒ Pronucleii prea mici pentru a fi injectați ușor: (a) ovulele au fost injectate la scurt timp după fecundare; Se modifică momentul administrării hormonilor și ciclul lumină-întineric sau se injectează mai târziu în cursul zilei; (b) variații de linie; se încearcă altă linie de șoarece.
- ⇒ Acul rămâne atașat de materialul ovocitar după scoaterea din ou: (a) acul scos prea încet; (b) ac murdar; (c) acul a atins nucleolii.
- ⇒ Acele se înfundă prea des: (a) ADN impur; modificarea metodei de purificare (se recomandă centrifugarea în CsCl) sau se diluează ADN de 2-3 ori cu tampon de injectare; (b) deschiderea acului prea mică; (c) presiune de injectare insuficientă.
- ⇒ Prea multe ovule alterate după injectare: (a) deschiderea acului prea mare; (b) unghiul dintre axa lungă a acului și platina microscopului prea mare; (c) ac murdar; (d) cel care face injectarea are nevoie de mai multă experiență.
- ⇒ Incapacitatea de a penetra membrana plasmatică sau pronucleul: (a) ac bont.
- ⇒ Dacă sunt cultivate după injectare, ovulele nu se divid: (a) ovulele nu sunt fecundate; (b) mediu de cultură necorespunzător; (c) temperatura și concentrația CO₂ din incubator nu sunt optime; Se testează prin cultivarea ovulelor neinjectate; (d) ovule menținute prea mult la temperatura camerei în timpul injectării; (e) ovule alterate mecanic prin injectare; (f) impurități toxice în ADN; (g) concentrația sau volumul de ADN injectat prea mare; (h) exprimarea tranzitorie a toxicității genei injectate în ovule.
- ⇒ Procent scăzut de gestație: (a) nu s-a realizat starea de pseudogestație; (b) ovulele nu s-au implantat; (c) femelele au fost traumatizate prin chirurgie sau anestezie; (d) multe ovule alterate prin injectare sau prepararea ADN.
- ⇒ Frecvență redusă de transgenici: (a) volum prea mic de ADN injectat; (b) concentrația ADN mai scăzută decât cea estimată; (c) ADN diluat cu mediu de cultură; (d) ADN injectat în citoplasmă, nu în pronucleu; (e) exprimarea transgenei este toxică pentru fetus.
- ⇒ Șoarecele transgenic fondator se împerechează, dar nu transmite transgena progeniturii: (a) șoarecele fondator este mozaic; prezintă câteva sau nu prezintă celule transgenice în linia germinală; (b) exprimarea transgenei este toxică pentru generația/embrionii F₁, însă fondatorii supraviețuiesc datorită mozaicismului; (c) fondatorul nu este transgenic, ci doar fals pozitiv.

V. METODE DE TRANSFER GENIC ÎN CELULELE STEM EMBRIONARE

A. Tipuri de celule stem cu origine embrionară

Există trei categorii de celule stem pluripotente, care pot genera tipuri celulare aparținând tuturor foilor embrionare: (1) celule ale carcinoamelor embrionare, obținute din populația de celule stem a teratocarcinoamelor; (2) celule stem germinale embrionare, izolate din celulele germinale primordiale, ale embrionilor aflați la 9 zile jumătate - 12 zile jumătate post-împerechere; (3) celule stem embrionare, izolate din blastomerele embrionului timpuriu, din stadiul de 8 celule până în stadiul de blastocist.

Toate cele trei tipuri celulare prezintă următoarele caracteristici: (1) conțin fosfataza alcalină; (2) exprimă antigenul embrionar SSEA-1¹² și factorul transcripțional Oct-4¹³; (3) o fază G1 scurtă a ciclului celular; (4) activitate telomerazică mare. Proliferarea celulelor stem embrionare și a celulelor germinare embrionare este controlată de citokine, în timp ce celulele carcinoamelor embrionare fiind derivate din teratocarcinoame maligne proliferază independent de factorii de creștere și citokine, dar diferențierea lor poate fi indusă în prezența unor agenți chimici (Prelle și al., 2002).

Deși pluripotența este un aspect esențial al celulelor stem embrionare, nu toate celulele stem pluripotente sunt echivalente celulelor stem embrionare. Proprietățile definitorii și unice ale celulelor stem embrionare și celulelor stem germinale sunt următoarele: (1) să aibă originea în masa celulară internă/epiblast (sau în celulele germinale primordiale pentru celulele stem germinale); (2) cariotip diploid stabil; (3) să genereze clone celulare; (4) capacitate de auto-reînnoire nelimitată; (5) capacitate de amplificare mare; (6) pluripotente, pot genera toate tipurile celulare fetale și adulte *in vitro* și în teratom; (7) blocarea extrinsecă a diferențierii de către citokina gp130 sau alți stimuli; (8) exprimarea factorului transcripțional Oct-4; (9) absența punctului de control din faza G1 a ciclului celular; (10) absența inactivării cromozomului X (în liniile XX); (11) încorporarea în embrion și contribuția la toate foiele embrionare în himere; (12) colonizarea liniei germinale și transmiterea la descendenți.

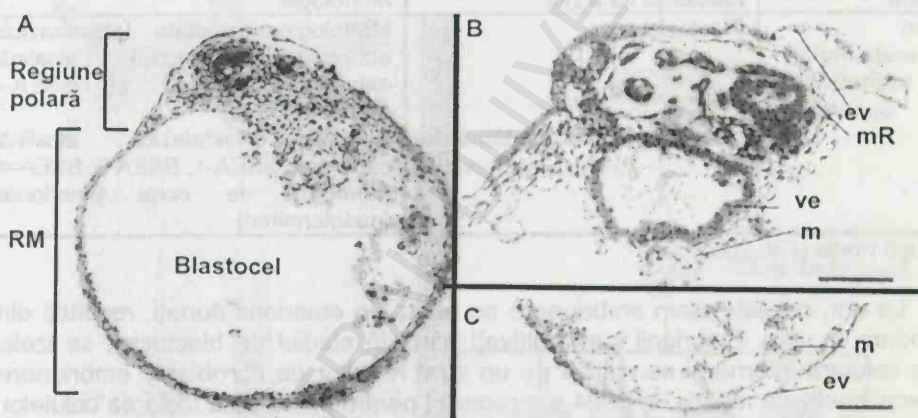


Fig.72. Secțiuni histologice printr-un corp embrionar. A-secțiune longitudinală. B-Detaliu la nivelul regiunii polare. C-Detaliu la nivelul regiunii murale (RM). ev-endoderm visceral. m-mezoderm. mR-membrana Reichert. ve-veziculă ectodermală.

Celulele stem embrionare se diferențiază rapid, când sunt lipsite de LIF¹⁴ sau stratul hrănitor de fibroblaste și formează **corpi embrionari** (Fig.72). Corpii embrionari au o organizare asemănătoare embrionilor timpurii (ectoderm, mezoderm, endoderm) și o cavitate similară blastocelului (O'Shea, 1999). Diferențierea celulară și formarea corpiilor embrionari are loc similar cu cea *in vivo*, dar în absența organizării axiale sau a elaborării unui plan corporal. Corpii embrionari conțin multe tipuri celulare (endoderm, sac vitelin, mezoderm, țesut hematopoietic, mastocite, celule dendritice,

¹²Stage-specific embryonic antigen

¹³Se leagă de o secvență octamerică din ADN.

¹⁴Leukemia inhibitory factor

celule endoteliale, cardiomiocite, mușchi striat, mușchi neted, adipocite, osteoblaste, condrocite, keratinocite, neuroni, astrocite, oligodendrocite).

Linii de celule stem embrionare au fost obținute și de la alte specii, inclusiv om (Tabel 4).

Tabel 4. Linii stabilizate de celule embrionare pluripotente

Specia	Sursa embrionară	Caracteristici tip celule stem embrionare
<i>Oryzias latipes</i>	Blastulă mijlocie	Activitate fosfatazică alcalină
Găină	Blastoderm stadiul X	Activitate fosfatazică alcalină Formarea de corpi embrionari Exprimarea SSEA-1; SSEA-3 Morfologie
Iepure	Embrioni de 5 zile Crestele genitale, ziua a 5-a	Formarea de corpi embrionari Exprimarea SSEA-1 Activitate fosfatazică alcalină
Porc	Blastocist Crestele genitale zilele 25-27	Formarea corpiilor embrionari Formarea corpiilor embrionari Activitate fosfatazică alcalină
Vacă	Blastocist Crestele genitale, ziua 45	Morfologie Morfologie, pseudopode
Oaie	Blastocist de 8 zile	Morfologie
Om	Blastocist Crestele genitale, săptămânile 5-9	Morfologie, activitate telomerazică, activitate fosfatazică alcalină, exprimare SSEA-3 și SSEA-4 (nedeterminate) Activitate fosfatazică alcalină, exprimare SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4 Formarea de corpi embrionari (nedeterminat)

(După Prella și al.,2002)

La om, celulele stem embrionare se obțin din embrionii donați, rezultați dintr-o fecundare *in vitro*. Embrionii sunt cultivați până în stadiul de blastocist, se izolează masa celulară internă și se cultivă pe un strat hrănitor de fibroblaste embrionare de șoarece inactivate mitotic. În 1994 s-a raportat pentru prima dată izolarea celulelor din masa celulară internă a blastocistului uman la 8 zile post-inseminare și cultivarea pe celule hrănitoare epiteliale oviductale (Bongso și al. 1994). Ulterior, au fost stabilite linii de celule stem embrionare umane, menținute în stare nediferențiată. În prezent, există 64 de linii de celule stem embrionare umane, aproape toate derivate din embrioni donați în cadrul programelor de fecundare *in vitro*. Până în prezent, o singură clinică de fecundare *in vitro* a stabilit linii de celule stem embrionare derivate din ovocite donate și fecundate în scopul stabilirii celulelor stem (Lanzendorf și al.,2001). Celulele germinale primordiale umane obținute de la fetuși de 5-9 săptămâni au fost cultivate pe fibroblaste hrănitoare STO în prezență de LIF și FGFB¹⁵.

¹⁵Fibroblast growth factor, basic, factor de creștere fibroblastic, basic, engl.

Capacitatea celulelor din masa internă a blastocistului de a forma corpi embrionari va conduce în viitor la clonarea terapeutică, ca metodă de transplant autolog. În acest caz, fiecare pacient va furniza propriile celule somatice de la care se vor preleva nucleii pentru a fi fuzionați cu ovocite enucleate provenite de la ei înșiși sau de la donatori. După formarea blastocistului, se obțin culturi de celulele stem embrionare autoloage, care ulterior se diferențiază *in vitro*, pentru a forma corpi embrionari. Din corpii embrionari se izolează acele celule diferențiate necesare pacientului (Fig.73). Aceste celule odată transplantate nu vor determina probleme de histocompatibilitate, permițând tratamentul o perioadă lungă de timp (Prelle și al.,2002).

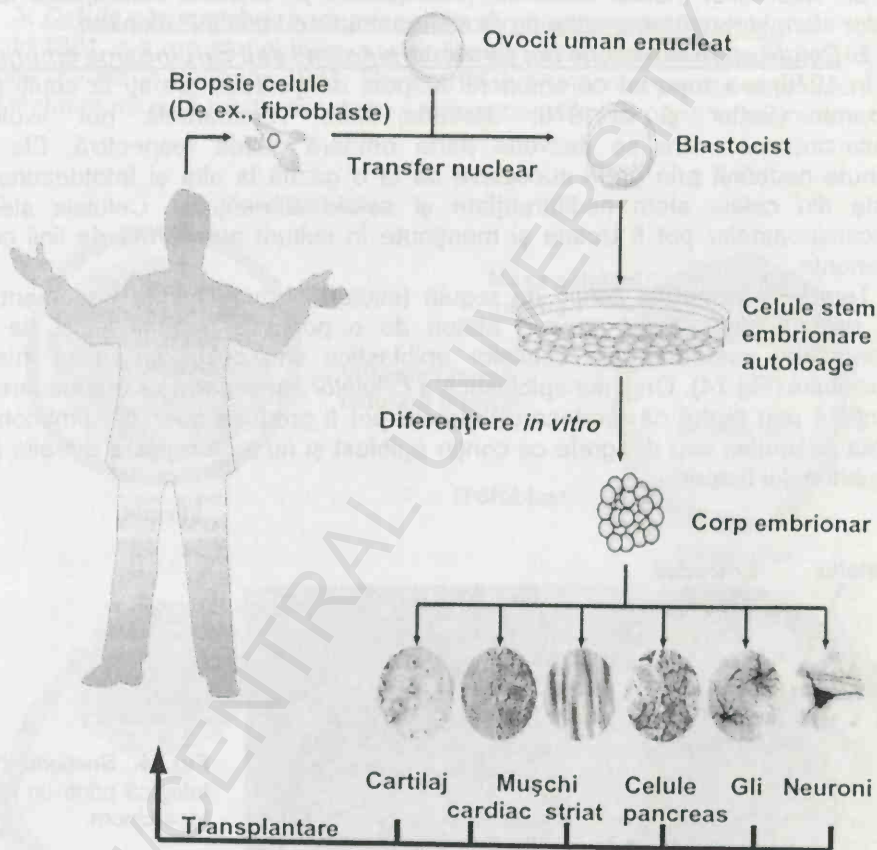


Fig.73. Schema clonării terapeutice.

Una din problemele majore ale transferului tehnologiei celulelor stem embrionare în clinică este aceea că diferențierea *in vitro* determină întotdeauna formarea unei populații celulare heterogene, derivate din toate foilele embrionare. În plus, celulele stem pluripotente trebuie eliminate pentru a evita formarea tumorilor după transplantarea lor într-un țesut sau organ bolnav. Nu se cunoaște încă dacă celulele introduse în anumite regiuni migrează în regiunea dorită și nu în altă parte.

Pentru aplicațiile clinice, celulele stem embrionare sunt necesare în cantități foarte mari. Din păcate, celulele stem embrionare umane proliferază mai încet decât cele de șoarece și eficiența lor de clonare este foarte scăzută, însă poate fi îmbunătățită prin adăugarea de FGFB.

Până în prezent, există puține dar remarcabile exemple de celule stem embrionare de șoarece transplantate la animale cu boli sau leziuni. Cardiomiocitele derivate din celulele stem embrionare au fost capabile să formeze grefe stabile, aparent funcționale la șoarece. Celulele precursorale gliale transplantate în șobolani de o săptămână, ce prezentau deficiență mielinică au interacționat cu neuronii gazdă din creier și măduva spinării pentru a produce mielină. În plus, neuronii diferențiați din celulele stem embrionare umane determină restabilirea funcției motorii la șobolani cu lezări ale neuronilor motori. Rezultate promițătoare pe animale încurajează testarea celulelor stem embrionare umane pe modele animale cu boală Parkinson.

1. Celule stem provenite din teratocarcinoame sau carcinoame embrionare

În 1970, s-a raportat că embrionii timpurii de șoarece greșați la adulți produc teratoame (Solter și al., 1970; Stevens, 1970). Teratoamele pot evolua în teratocarcinoame, care se dezvoltă până omoară gazda respectivă. Ele pot fi menținute nedefinit prin grefe succesive de la o gazdă la alta și întotdeauna vor fi formate din celule stem nediferențiate și celule diferențiate. Celulele stem ale teratocarcinoamelor pot fi izolate și menținute în cultură sub formă de linii celulare permanente.

Teratocarcinoamele conțin de regulă țesuturi dispuse haotic (tegument, țesut osos, mușchi striat, țesut nervos) alături de o populație semnificativă de celule nediferențiate, asemănătoare celulelor epiblastice sau celor din masa internă a blastocistului (Fig. 74). Originea epiblastică a celulelor carcinoamelor embrionare a fost evidențiată prin faptul că teratocarcinoamele pot fi produse doar din embrioni aflați înaintea gastrulării sau din grefe ce conțin epiblast și nu se formează din alte regiuni ale embrionului timpuriu.

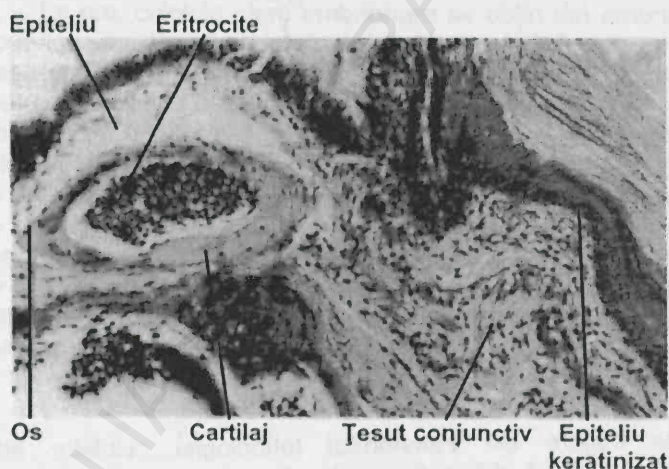


Fig.74. Secțiune histologică printr-un teratocarcinom.

Majoritatea liniilor de celule stem derivate din carcinoame embrionare prezintă un potențial de diferențiere scăzut *in vitro* și *in vivo* și/sau produc tumori embrionare. Ele colonizează foarte rar linia germinală, după injectarea în blastocist. În plus, celulele carcinoamelor embrionare sunt aproape întotdeauna aneuploide, probabil ca

rezultat al presiunilor de selecție necontrolate din faza de creștere a tumorii. În consecință, ele nu sunt capabile să sufere meioza pentru a produce gameți maturi.

2. Celule stem germinale embrionare

Teratocarcinoame testiculare pot rezulta spontan din celule germinale. Ele sunt frecvente la liniile de șoareci 129. *In vitro*, în prezența FGF-2 celulele germinale primordiale sunt convertite după câteva zile, în celule asemănătoare celulelor stem embrionare, care pot fi menținute nedefinit. În multe aspecte ele nu se disting de celulele stem embrionare derivate din blastocist, se pot transmite în linia germinală și cel puțin anumite linii pot contribui eficient la formarea de himere. Spre deosebire de celulele stem embrionare provenite din masa internă a blastocistului, lipsa întipăririi genomice în cursul dezvoltării celulelor germinale determină anomalii embrionare de tipul creșterii aberante și a anomaliilor scheletice la himere.

3. Celule stem embrionare provenite din blastocistul timpuriu

În 1981, s-a raportat obținerea unor linii de celule pluripotente din blastocistul de șoarece (Evans și Kaufman, 1981; Martin, 1981). Protocolul pentru obținerea celulelor stem embrionare este relativ simplu și a rămas neschimbat până în prezent.

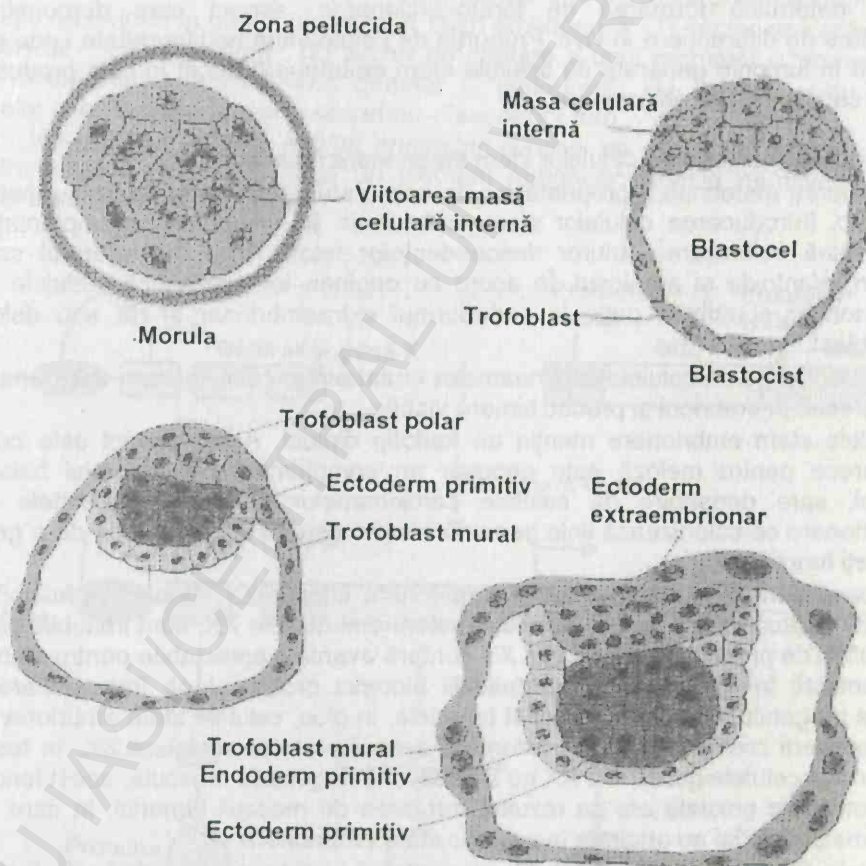


Fig.75. Schema dezvoltării timpurii la șoarece.

La șoarece, în a treia zi jumătate, embrionul este format din masă celulară internă și trofotoderm (Fig.75). Masa celulară internă generează embrionul și anexele extraembrionare, de tipul alantoidei și amniosului, în timp ce trofotodermul contribuie doar la trofoblastul placentei. Înaintea implantării apare endodermul primitiv, în timp ce trofotodermul, ce acoperă masa celulară internă continuă să prolifereze și formează trofoblastul diploid al placentei. Celulele situate la distanță de masa celulară internă își opresc diviziunea și formează prin endoduplicarea ADN celule gigantice trofoblastice.

În cursul dezvoltării *in vivo*, masa celulară internă formează epiblastul post-implantațional timpuriu. Acesta este o rezervă tranzitorie de celule pluripotente, care se diferențiază rapid în momentul gastrulării, în foițele embrionare primare. Deși prezența celulelor stem pluripotente este tranzitorie *in vivo*, se pot obține linii celulare imortalizate *in vitro* prin cultivarea celulelor din masa celulară internă a blastocistului în prezența citokinelor, a factorului inhibitor leucemic (LIF) sau pe un strat hrănitor de fibroblaste primare, inactivate cu mitomicină C (blochează ireversibil proliferarea celulară). LIF este o citokină care aparține familiei IL-6 și activează factorul transcripțional STAT3. Se preferă folosirea stratului hrănitor, deoarece este un procedeu mai puțin costisitor.

Transplantarea ectopică a celulelor stem embrionare sub capsula renală sau în testicul, determină formarea de teratocarcinoame, aspect care demonstrează capacitatea de diferențiere *in vivo*. Proporția de celule stem nediferențiate tinde să fie mai mică în tumorile generate de celulele stem embrionare decât în cele produse de celulele carcinoamelor embrionare.

Dintre caracteristicile celulelor stem embrionare amintim:

- ⇒ Menținerea nedefinită a proprietăților de celulă stem, indiferent de timpul petrecut *in vitro*. Introducerea celulelor stem embrionare în embrionul pre-implantațional determină colonizarea tuturor descendențelor fetale, plus mezodermul sacului vitelin, alantoida și amniosul. În acord cu originea lor epiblastică, celulele stem embrionare contribuie puțin la endodermul extraembrionar și rar sau deloc la trofoblast.
- ⇒ Spre deosebire de celulele carcinoamelor embrionare, celulele stem embrionare se integrează în embrioni și produc himere viabile.
- ⇒ Celulele stem embrionare mențin un kariotip diploid. Acest aspect este crucial, deoarece pentru meioză este necesar un complement cromozomial balansat. Astfel, spre deosebire de celulele carcinoamelor embrionare, celulele stem embrionare ce colonizează linia germinală într-o himeră sunt capabile de a genera gameți funcționali.
- ⇒ Marea majoritate a celulelor stem embrionare sunt 40XY. Deoarece în epiblast, ambii cromozomi X sunt activi, celulele stem embrionare XX, sunt instabile sau au dificultăți de propagare. Genotipul XY conferă avantaje apreciabile pentru stabilirea transmiterii în linia germinală. Masculii himerici produc după împerechere mai multe progenituri transgenice decât femelele. În plus, celulele stem embrionare XY pot converti creasta genitală indiferentă a unui embrion recipient XX, în testicul. Pentru că celulele germinale XX nu se dezvoltă în gonada masculă, acest fenomen de conversie sexuală are ca rezultat formarea de masculi himerici, în care toate spermatoците își au originea în celulele stem embrionare.
- ⇒ Celulele stem embrionare sunt descrise uneori ca totipotente, referire la faptul că pot da naștere tuturor celulelor, inclusiv celor germinale. Cu toate acestea, celulele stem embrionare nu pot produce toate tipurile celulare. Așa cum am menționat nu pot produce trofotoderm. Ele nu pot genera un blastocist *de novo* și nu sunt

suficiente pentru a produce un embrion întreg. Din acest motiv, celulele stem embrionare pot fi descrise ca pluripotente. Pentru a testa dacă celulele stem embrionare pot genera componentele fetale s-au introdus în embrioni tetraploizi. În embrionii tetraploizi, descendențele extraembrionare sunt produse normal, însă descendențele fetale se dezvoltă puțin. În himerele dintre embrionii diploizi și tetraploizi, fetoșii sunt alcătuiți aproape exclusiv din celule diploide. Celulele stem embrionare au proprietatea de a domina contribuția tetraploidă, și fetoșii rezultați se pot dezvolta la termen cu puține sau fără celule tetraploide. Deși se pot obține nou-născuți din himere tetraploide și celule stem embrionare, mulți embrioni mor în uter și cei care se dezvoltă la termen de obicei mor la scurt timp după naștere.

B. Introducerea genelor în celulele stem embrionare

Există două categorii de modificări genomice care pot fi realizate în celulele stem embrionare, directe și indirecte. Modificările directe includ țintirea genică, în timp ce cele indirecte sunt întâmplătoare și cuprind transgeneza și mutagenеза. Celulele stem embrionare se folosesc pentru obținerea de organisme transgenice și mutații "loss-of-function", așa numitul genotip nul sau knock-out.

S-au dezvoltat trei tipuri de vectori pentru a fi introduși prin electroporare sau infecție retrovirală în genomul celulelor stem embrionare: (1) vector de captare a unui enhancer - "enhancer-trap"; (2) vector de captare a unui promotor - "promoter-trap"; (3) vector pentru descoperirea genelor - "gene-trap"; (4) vector pentru captarea genelor care codifică proteine secretate - "secretory trap".

Vectorul de captare a unui enhancer conține un promotor minimal, necesar pentru inserția vectorului lângă un element enhancer. Acesta permite exprimarea genei raportoare *lacZ* (Fig.76).

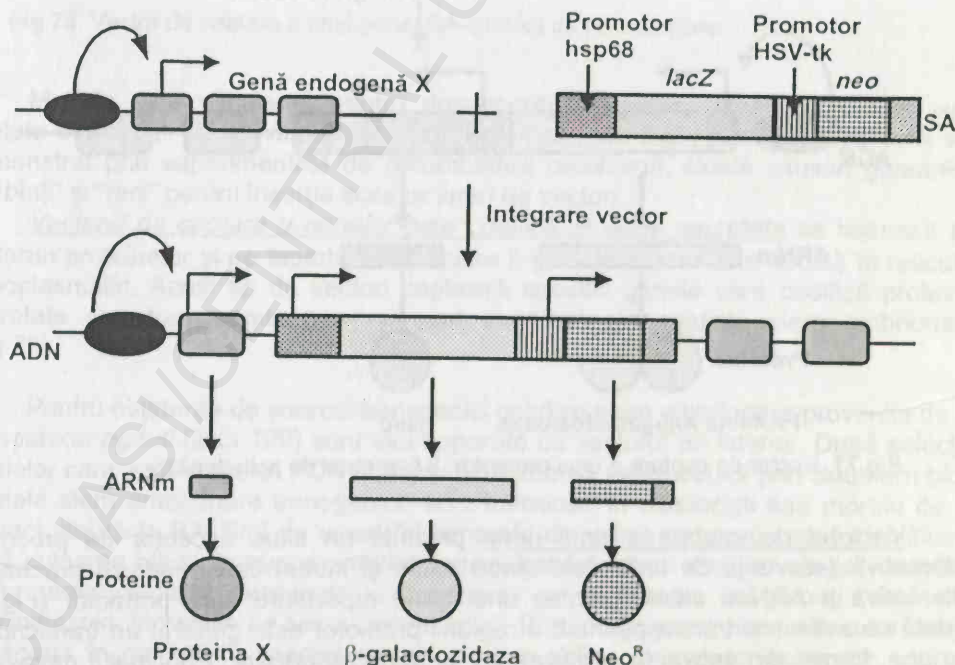


Fig.76. Vector de captare a unui enhancer. SA-semnal de poliadenilare.

Acest tip de vectori au fost testați prima dată prin injectare în pronuclei. Mai mult de 20% din liniile transgenice rezultate au arătat modele restrictive ale exprimării genei raportoare în timpul embriogenezei, cel puțin 5% din inserții fiind mutagene, ceea ce indică că această strategie poate fi folosită pentru a capta diferiți loci. Metoda este mai eficientă în celulele stem embrionare.

Vectorul de captare a unui promotor prezintă o genă raportoare fără promotor și un marker selectabil (Fig.77). Exprimarea raportorului și mutagenеза au loc când vectorul se inseră într-un exon, pentru a genera un transcript de fuziune, format din secvența exonică endogenă, localizată înaintea genei raportoare. Deoarece transcrierea raportorului necesită inserția vectorului într-un exon, rata de mutagenеза a acestor vectori ar trebui să fie foarte mare. În plus, deoarece situsul de inserție este într-un ADN transcris, prin clonarea situsului de inserție se poate identifica gena modificată. Cu toate acestea, frecvența acestor vectori este scăzută, cel puțin de 200 de ori mai scăzută decât în cazul captării unui enhancer. Vectorii "promoter trap" conțin în general un marker selectabil de tipul genei care conferă rezistență la neomicină (neo) sau markerul fuzionat β -galactozidază-Neo^R (β -geo), ca raportor, astfel încât doar clonele de celule stem embrionare ce conțin vectorul pot fi selectate. Aceasta înseamnă că vor fi selectate doar inserțiile în genele transcripțional active din celulele stem embrionare.

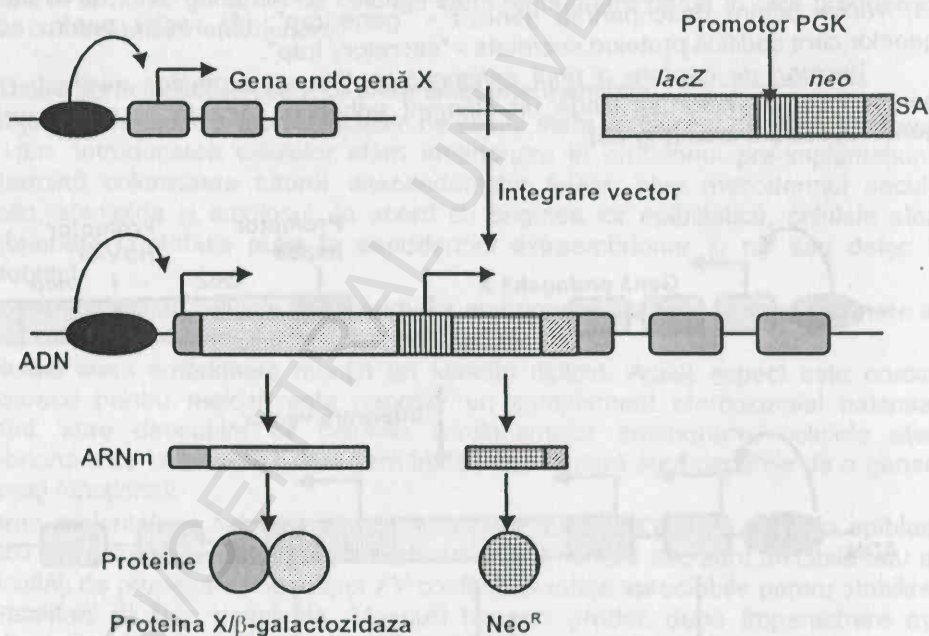


Fig.77. Vector de captare a unui promotor. SA-semnal de poliadenilare.

Vectorul de captare a unei gene prezintă un situs acceptor de procesare alternativă (secvențe de la limitele dintre exoni și introni care mediază procesarea alternativă a ARNm) situat înaintea unei gene raportoare, fără promotor (Fig.78). Odată cu activarea transcripțională a regiunii promotor este generat un transcript de fuziune, format din secvența codificatoare și gena raportoare. Principalul dezavantaj pentru folosirea vectorilor "gene trap" este acela că datorită faptului că inserția are loc

Într-un intron, uneori poate avea loc procesarea alternativă conducând la nivele scăzute ale moleculelor transcript normale, adesea rezultând alele hipomorfe (o alelă mutantă care nu elimină funcția normală a genei și poate da un fenotip mai puțin sever decât o mutație "loss of function").

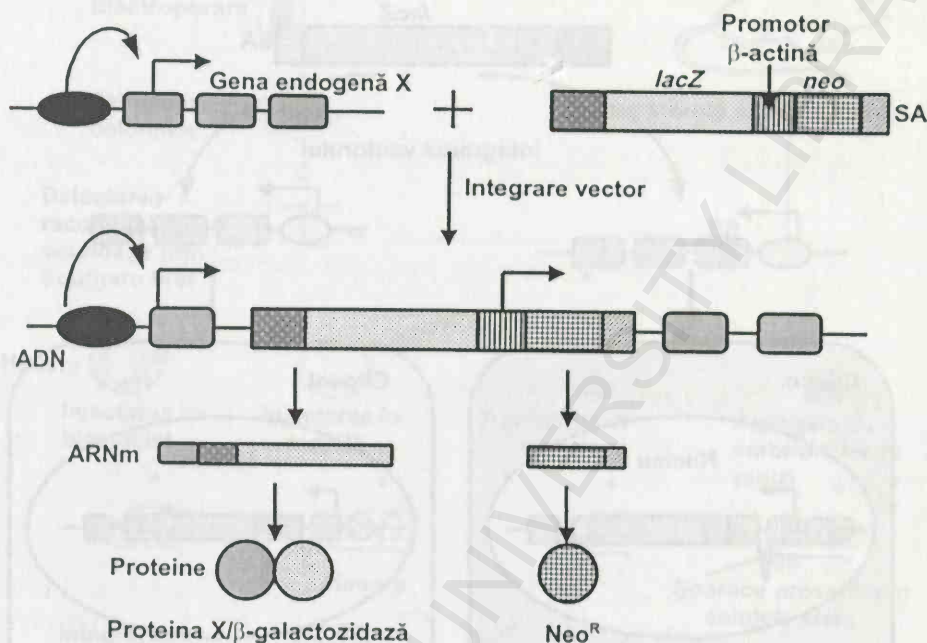


Fig.78. Vector de captare a unei gene. SA-semnal de poliadenilare.

Metoda este excelentă pentru descoperirea genelor, deoarece genele sunt captate indiferent de activitatea lor transcripțională. Cu toate acestea, așa cum s-a demonstrat prin experimentele de recombinare omoloagă, există situsuri genomice "fierbinți" și "reci" pentru inserția acestor tipuri de vectori.

Vectorul de captare a genelor care codifică proteine secretate se bazează pe sortarea proteinelor și pe faptul că activitatea β -galactozidazei este abolită în reticulul endoplasmatic. Acest tip de vectori captează specific genele care codifică proteine secretate sau transmembranare și sunt exprimate în celulele stem embrionare (Fig.79).

Pentru obținerea de șoareci transgenici celulele stem embrionare provenite de la un șoarece *agouti* (linia 129) sunt electroporate cu vectorul de interes. După selecția celulelor care au încorporat ADN străin și confirmarea recombinării prin Southern blot, celulele stem embrionare transgenice sunt introduse în blastociști sau morule de la șoareci albi (linia BALB/c). În acest fel himerele din prima generație sunt identificate după culoarea blănii. În cursul embriogenezei, celulele stem embrionare pot contribui la formarea celulelor germinale și transgena se va integra în gameți (ovul sau spermatozoid, în funcție de sexul embrionului). Prin încrucișarea himerelor care conțin transgena în gameți cu șoareci normali se vor obține în a doua generație șoareci heterozigoți pentru transgenă. Împerecherea heterozigoților între ei va determina

obținerea unui procent de 25% șoareci homozigoți pentru transgenă. Acești șoareci vor constitui o linie transgenică fondatoare (Fig.80).

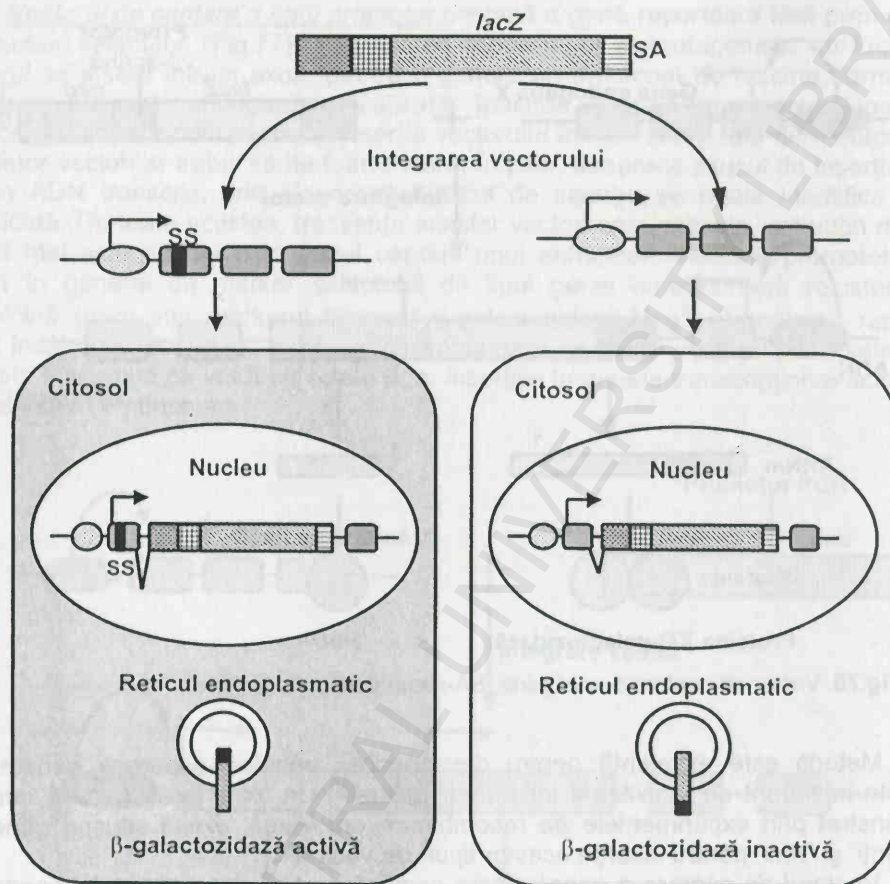


Fig.79. Vector de capture a genelor care codifică proteine secretate. SA-semnal de poliadenilare. SS-secvență semnal.

C. Organisme knock-out

Șoarecii cu mutații nule sunt cunoscuți sub denumirea de "knock-out" și furnizează dovezi experimentale referitoare la funcția proteinei codificată de gena mutantă.

Pentru a se transmite la descendenți și a stabili o linie transgenică, mutația dorită trebuie introdusă în celulele liniei germinale. În acest scop se introduce prin transfecție (mai ales prin electroporare) în celulele stem embrionare un vector, ce conține gena mutantă și markeri de selecție, flancate de secvențe omoloage țintei genomice. Vectorul se "împerechează" cu secvența ADN cromozomială înrudită și gena mutantă înlocuiește prin recombinare omoloagă secvența genomică (Muller,1999).

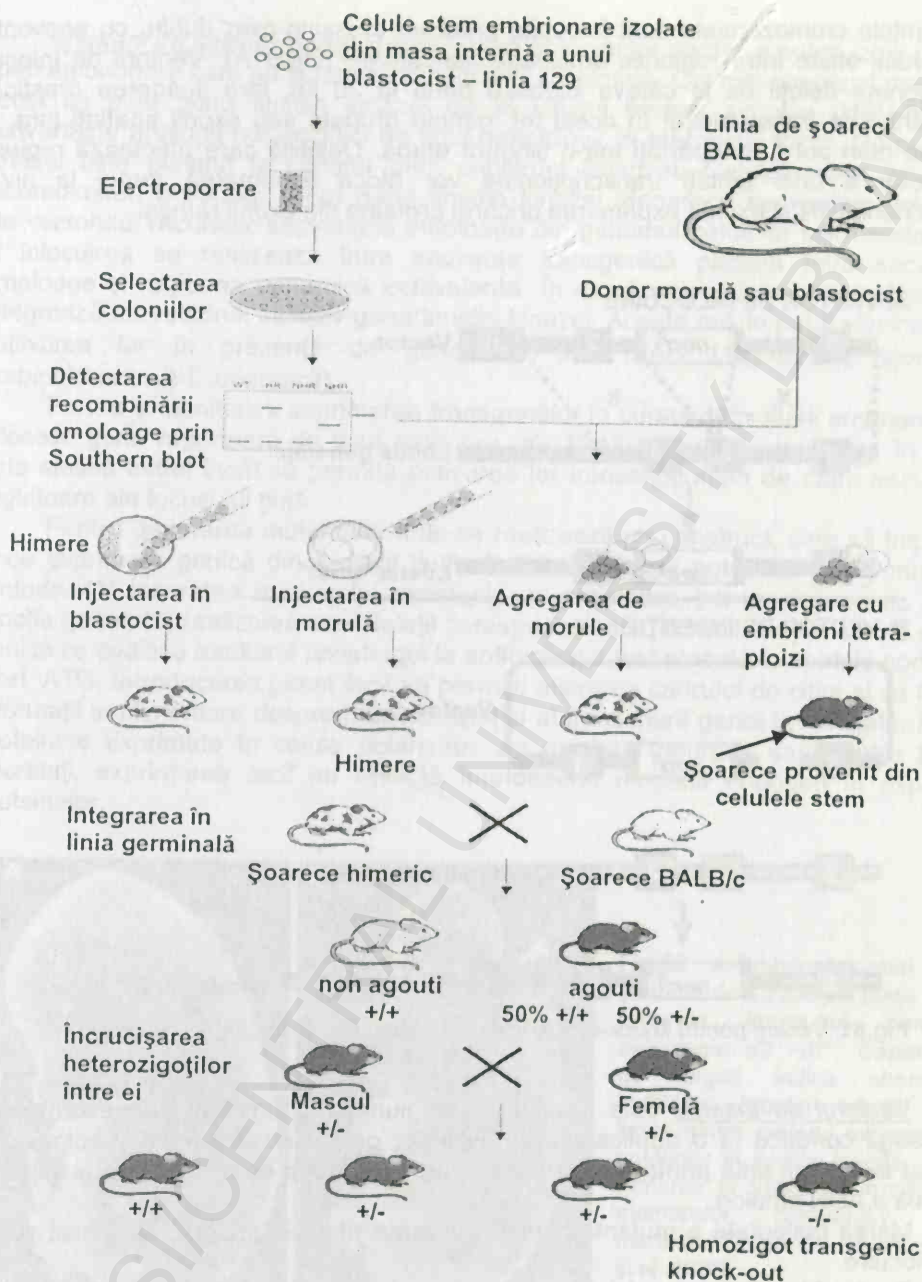


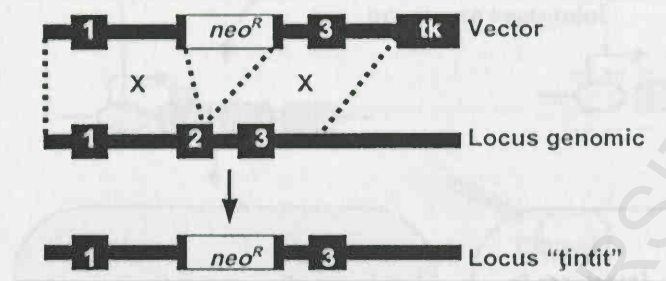
Fig.80. Schema generării șoarecilor transgenici și knock-out.

Pentru a realiza șoareci knock-out se folosesc două tipuri de vectori: de înlocuire și de inserție (Fig.81).

Vectorul de înlocuire este liniarizat în afara regiunii omoloage, astfel încât secvențele vectorului rămân coliniare cu secvențele genei țintă. În cursul recombinării,

secvențele cromozomiale sunt înlocuite printr-un crossing-over dublu, cu secvențele vectorului aflate între regiunile omoloage flancatoare (Fig.81A). Vectorii de înlocuire pot genera deleții de la câteva kilobaze până la 20 kb, fără scăderea drastică a frecvenței de transgeneză. În acest fel, genele grupate sau exonii spațiați larg, din genele mari pot fi îndepărtați într-o singură etapă. Delețiile care afectează regiunea promotor a unei unități transcripționale vor bloca exprimarea genei la nivelul transcrierii ARN și exclud exprimarea oricărei proteine din exonii rămași.

A. VECTOR DE ÎNLOCUIRE



B. VECTOR DE INSERȚIE

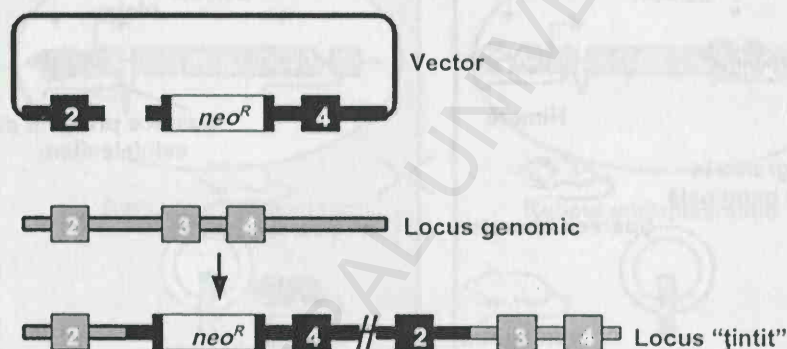


Fig.81. Vectori pentru knock-out. A-Vector de înlocuire. B-Vector de inserție.

Vectorul de inserție este liniarizat în regiunea de omologie și recombinarea omoloagă conduce la o duplicare a secvențelor genomice (Fig.81B). Vectorul este inserat la locusul țintă printr-un singur crossing-over, ceea ce conduce la o duplicare parțială a ADN omolog.

Marea majoritate a mutantelor nule generate până în prezent au folosit vectori de înlocuire.

Pentru identificarea celulelor stem care au suferit recombinarea se folosesc markeri de selecție pozitivi și negativi.

Markerii de selecție pozitivi permit identificarea și izolarea celulelor stem embrionare care au suferit recombinarea, omoloagă sau neomoloagă. Cel mai comun marker pozitiv de selecție folosit este o casetă ce conține gena rezistenței la neomicină aflată sub controlul unei regiuni promotor puternice. Se poate utiliza și o casetă ce conferă rezistență la higromicină, puromicină sau histidinol.

Markerii de selecție negativi sunt introduși în vector pentru a putea izola celulele stem embrionare care au suferit recombinarea omoloagă. Cel mai cunoscut marker de acest tip este gena timidin kinazei de la virusul herpes simplex (HSV-tk¹⁶), ce convertește analogii nucleozidici de tipul ganciclovir în metaboliți toxici. Gena timidin kinazei este plasată la capătul unui construct liniarizat. Celulele care au suferit recombinarea omoloagă pierd gena timidin kinazei, deoarece secvențele omoloage ale vectorului recunosc secvențele omoloage din genomul celulelor stem embrionare și înlocuirea se realizează între secvența transgenică plasată între secvențele omoloage și regiunea genomică echivalentă. În cazul recombinării neomoloage, se integrează tot vectorul, inclusiv gena timidin kinazei. Aceste celule pot fi eliminate prin cultivarea lor în prezență de ganciclovir sau FIAU [1-(2-deoxi-2-fluoro-β-D-arabinofuranosil)-5 iodouracil].

Pentru a monitoriza exprimarea transgenelor în cursul dezvoltării embrionare se folosesc gene raportoare de tipul *lacZ* sau *gfp*. Poziția genelor raportoare în vector este aleasă astfel încât să permită activarea lor transcripțională de către secvențele reglatoare ale locusului țintă.

Pentru generarea mutantelor nule se realizează un construct, care să împiedice orice exprimare genică din locusul țintit. Astfel de mutații pot fi realizate prin două metode: (1) inserarea markerului rezistenței la antibiotice într-un exon critic pentru funcția genei; (2) realizarea unei deleții corespunzătoare. În multe experimente caseta genică ce codifică markerul rezistenței la antibiotice a fost plasată în spatele codonului start, ATG. Introducerea genei *lacZ* va permite alterarea cadrului de citire și va furniza informații suplimentare despre modelul spațial al transcrierii genei investigate. Pentru proteinele exprimate în celule polarizate, de exemplu neuroni, sau pentru factorii secretați, exprimarea *lacZ* nu reflectă întotdeauna modelul endogen al exprimării proteinelor.

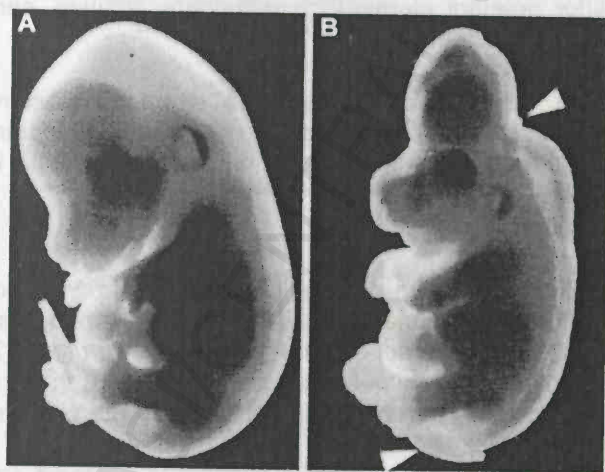


Fig.82. A-Embrion normal de șoarece de 13 zile jumătate. B-Embrion knock-out pentru integrinele $\alpha 3^{-/-}/\alpha 6^{-/-}$. Capetele de săgeți indică absența închiderii tubului neural, la limita dintre creierul mijlociu și posterior și coada îndoită. Se remarcă și forma anormală a membrilor, comparativ cu mărtoarul. (După De Arcangelis și al., 1999).

Celulele stem modificate sunt introduse într-un blastocist care este transferat la o femelă purtătoare pseudogestantă. Himerele rezultate sunt identificate după culoarea blănii și sunt încrucișate cu șoarecii unei linii ce permite identificarea puilor derivați din celulele stem embrionare pe baza culorii ochilor sau a blănii. Dacă o alelă

¹⁶Herpes simplex virus thymidine kinase

a genei țintă a fost mutagenizată în celulele stem embrionare diploide, 50% din puii derivați din celulele stem embrionare se așteaptă a fi heterozigoți și poartă o alelă modificată (+/-). Încrucișarea șoarecilor heterozigoți între ei determină obținerea unei proporții de 25% șoareci homozigoți pentru mutația dorită (-/-), dacă aceasta nu este letală pentru embrion. În figura 82 este prezentat comparativ fenotipul normal și mutant în cazul unui knock-out dublu al integrinelor $\alpha 3^{-/-} \alpha 6^{-/-}$.

Deși generarea unui knock-out este adesea relativ simplă, s-au observat următoarele aspecte:

⇒ *Knock-out incomplet*

Analiza șoarecilor knock-out a evidențiat un fenotip mai puțin sever decât cel așteptat. Atâta timp cât secvențele codificatoare rămân prezente în genom, pot fi exprimate forme mutante sau trunchiate ale proteinei. În cazul în care markerul de selecție a fost inserat în exoni, se pot forma fragmente proteice trunchiate la capătul C-terminal. Deși mutația poate fi realizată într-un mod care ar distruge presupusa funcție a proteinei, polipeptida produsă poate căpăta proprietăți noi, de tipul interacțiilor transdominante cu alte proteine. În plus, pierderea unui produs genic poate fi compensată de alte gene și fenotipul rezultat poate fi asemănător cu cel sălbatic.

⇒ *Îndepărtarea regiunilor codificatoare sau a elementelor reglatoare ale altor gene*

Îndepărtarea tuturor exonilor poate evita exprimarea reziduală a proteinei. Pe de altă parte, generarea delețiilor genomice mari pot conduce la pierderea nedorită a genelor încă neidentificate (gene aflate în introni sau codificate de catena opusă) sau a elementelor reglatoare care guvernează exprimarea genelor neînrudite. Ultima posibilitate este valabilă în special pentru genele grupate, așa cum s-a evidențiat în cazul knock-out-urilor MRF4, realizate de trei grupuri independente. Trei alele diferite în care s-au realizat deleții ce cuprind diferite părți ale regiunii codificatoare MRF4, determină fenotipuri viabile și letale. Aceste diferențe fenotipice au fost atribuite ulterior deletării elementelor reglatoare pozitive, care conduc la o exprimare redusă a genei vecine, MRF5.

⇒ *Letalitatea embrionară*

Inactivarea constitutivă a genelor conduce la obținerea de embrioni deficienți pentru producția genelor deletate. Dacă genele respective sunt esențiale pentru dezvoltarea embrionară, embrionul moare și funcția genei nu poate fi studiată în stadiile embrionare avansate.

D. Knock-out condițional

Problemele asociate țintirii genice constitutive pot fi evitate prin folosirea tehnicii de țintire genică condițională (knock-out condițional). Această strategie genetică se folosește în următoarele cazuri: (1) inactivarea genei conduce la letalitate *in utero*; (2) prezența markerului selectabil poate influența fenotipul șoarecelui mutant; (3) în cazul compensării datorită lipsei produsului genic pe parcursul întregii vieți; (4) interpretarea mutațiilor nule este limitată (Prelle și al., 2002).

Cea mai folosită metodă de a realiza țintirea genică dependentă de țesut sau stadiu embrionar este cea mediată de sistemul Cre-*loxP*. Metoda implică folosirea recombinazei situs specifică Cre, de la fagul P1. Aceasta recunoaște și se leagă de o secvență țintă, parțial palindromică, de 34 pb numită loxP (*locus of crossover x in P1*). Secvența *loxP* conține două repetiții inversate de 13 pb, ce flanchează un miez nonpalindromic de 8 pb, care definește orientarea situsului de recunoaștere (Fig. 83). Inițial, o singură moleculă de recombinază se leagă la fiecare jumătate palindromică a

situsului *loxP*. Ulterior, molecula de recombinază formează un tetramer, ce unește cele două situsuri *loxP*.

În funcție de orientarea și localizarea situsului de recunoaștere se pot realiza deleții, inversii, translocatii sau inserții (Fig.83). Recombinaza Cre are capacitatea de a exciza eficient prin recombinare intramoleculară, orice secvență plasată între două situsuri *loxP*, cu aceeași orientare. Ca rezultat, un situs *loxP* rămâne în genom și altul este prezent pe fragmentul circular excizat. Dacă situsurile *loxP* au orientări opuse (configurație coadă-coadă) recombinarea va determina o inversie.

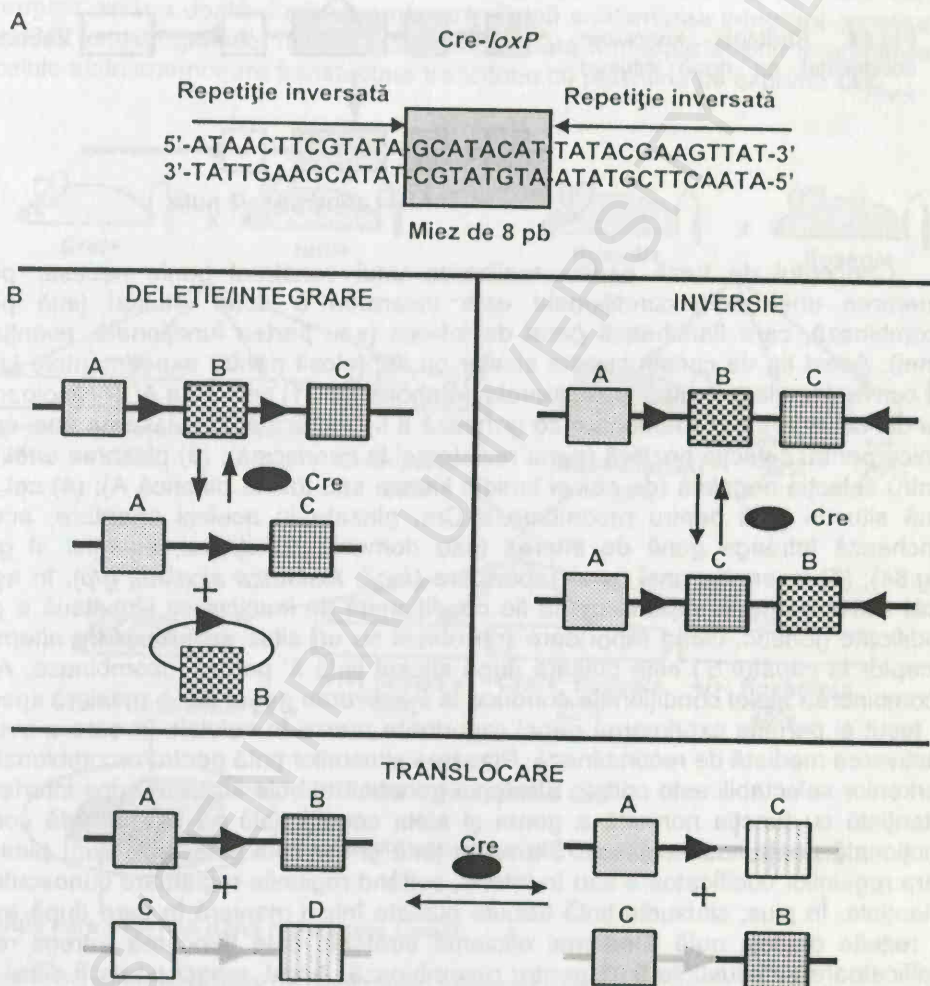
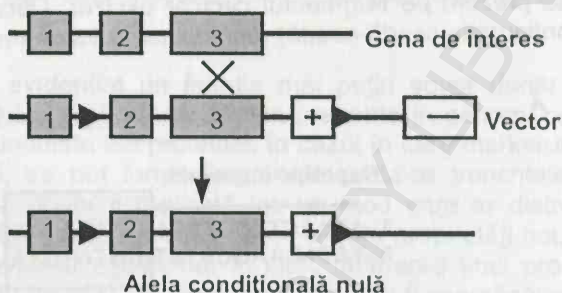


Fig.83. Structura și secvența situsului *loxP*. B-Produșii recombinării direcționate intra-și intermoleculare, între două situsuri de recunoaștere.

Pentru un experiment genetic condițional dependent de recombinază sunt necesare două linii transgenice de șoarece. O linie exprimă recombinaza Cre, în anumite tipuri celulare/țesuturi, într-un anumit stadiu embrionar sau al dezvoltării postnatale. Cealaltă linie poartă alela condițională (un segment genic sau întreaga

genă), flancată de două situsuri de recunoaștere *loxP*. După împerechere, în progenitura transgenică dublă, celulele care exprimă recombinaza deletează/modifică alela condițională, în timp ce în țesuturile unde recombinaza nu se exprimă, gena țintă rămâne intactă și funcțională. Astfel, funcția unei gene țintă poate fi studiată într-un anumit moment al dezvoltării, în celula sau țesutul de interes.

Fig.84. Strategia knock-out condițional cu două situsuri *loxP*.



Conceptul de bază pentru realizarea unui construct genic necesar pentru generarea unei alele condiționale este inserarea a două situsuri țintă pentru recombinază, care flanchează gena de interes (sau partea funcțională, esențială a genei). Acest tip de construct este similar cu cel folosit pentru experimentele knock-out convenționale și include următoarele componente: (1) secvența ADN omoloagă cu cea din celulele stem embrionare ce urmează a fi modificată; (2) plasarea unei casete genice pentru selecția pozitivă (gena rezistenței la neomicină); (3) plasarea unei gene pentru selecția negativă (de obicei timidin kinaza sau toxina difterică A); (4) cel puțin două situsuri țintă pentru recombinaza Cre, plasate în aceeași orientare; acestea flanchează întreaga genă de interes (sau domeniul funcțional, esențial al genei) (Fig.84); (5) inserarea unei gene raportoare (*lacZ*, *fosfataza alcalină*, *gfp*), în așa fel încât activarea genei raportoare să fie condiționată de inactivarea simultană a genei modificate genetic. Gena raportoare (de obicei cu un situs de procesare alternativă acceptor la capătul 5') este plasată după situsul țintă 3' pentru recombinază. Astfel, recombinarea alelei condiționale conduce la inactivarea genei într-o manieră specifică de țesut și permite exprimarea genei raportoare numai în celulele în care a avut loc inactivarea mediată de recombinază. Plasarea situsurilor țintă pentru recombinază și a markerilor selectabili este critică. Strategia genetică trebuie să evite orice interferență potențială cu funcția normală a genei și alela condițională să fie păstrată complet funcțională pentru recombinare. Situsurile țintă și markerii selectabili sunt plasați în afara regiunilor codificatoare sau în introni, evitând regiunile reglatoare cunoscute sau potențiale. În plus, situsurile țintă trebuie plasate într-o manieră în care după excizie să rezulte o alelă nulă. Cea mai eficientă strategie este flancarea întregii regiuni codificatoare cu situsurile țintă pentru recombinază. Acest aspect poate fi dificil dacă gena este mare, structura genei este nedefinită și/sau există elemente reglatoare în regiunile flancatoare 5' și 3'. În majoritatea cazurilor, situsurile țintă flanchează exonii, ce codifică o parte esențială, funcțională a genei (inclusiv cea cu situsul start al traducerii). Realizarea unui construct genic în care gena țintă este flancată de situsurile *loxP* se numește "floxare" (floxed¹⁷).

¹⁷Flanked by *loxP* sites

Așa cum am menționat mai sus, inactivarea genică condițională necesită ca gena de interes să funcționeze normal până în momentul exciziei de către recombinaza specifică. S-a demonstrat că prezența unui marker selectabil (de exemplu o casetă de exprimare *neo*) în regiunea 5' a situsului start al transcrierii sau într-un intron, influențează exprimarea genei țintă. Pentru a elimina această influență potențială asupra exprimării genei țintă și menținerea intactă a celor două situsuri țintă pentru recombinază s-a elaborat strategia cu trei situsuri *loxP*. Vectorul conține trei situsuri *loxP*, toate în aceeași orientare. Două situsuri *loxP* flanchează markerul de selecție pozitiv iar al treilea este plasat după primul exon, într-un mod care va determina excizia dorită după recombinare. După confirmarea integrării constructului 3-*loxP* în locusul genetic, markerul selectabil poate fi îndepărtat prin exprimarea Cre în celule stem embrionare transfectate tranzitoriu cu plasmidă ce exprimă Cre.

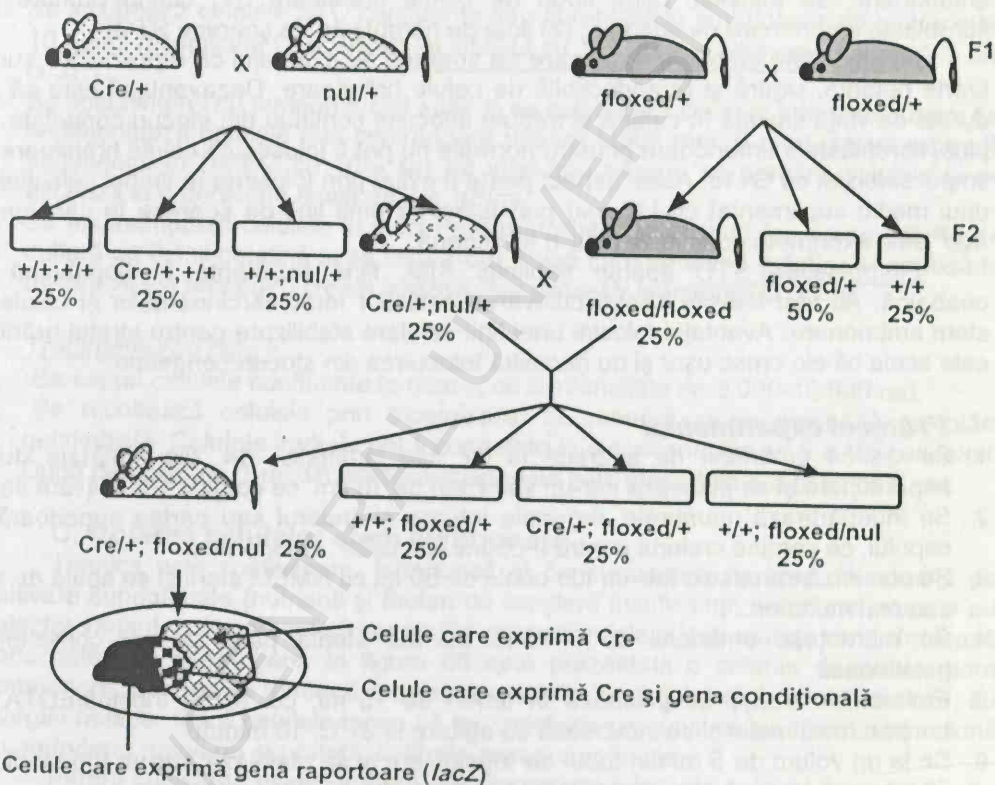


Fig.85. Schema încrucișării de bază pentru inactivarea genică condițională. Cu + este notată alela sălbatică.

Schema de încrucișare pentru a realiza inactivarea genică condițională la șoarece este prezentată în figura 85. Șoarecii heterozigoți pentru alelele nule, "floxati" și care conțin transgena *Cre*, exprimată într-un țesut specific (*Cre/+; floxed/nul*) pot fi obținuți după două generații, la o frecvență de 25%. Această frecvență presupune că locusul "floxat" și transgena *Cre* nu sunt legate. În multe cazuri, femelele gestante din

a doua generație sunt sacrificate pentru studierea embrionilor din a treia generație. Astfel, șoarecii (*Crel+*; *null+*) sunt de obicei masculi, în timp ce homozigoții "floxaji" (*floxed/floxed*) sunt de obicei femele. În cazul în care nu există linii de șoarece heterozigote nule, disponibile pentru obținerea masculilor, se pot folosi șoarecii *floxed/+* în locul celor *null+* (*Crel+*; *floxed/+*) (Kwan, 2002).

VI. IZOLAREA, CULTIVAREA ȘI MANIPULAREA CELULELOR STEM EMBRIONARE

A. Pregătirea stratului hrănitor de fibroblaste

Deși este posibilă cultivarea celulelor stem embrionare în absența celulelor hrănitoare, în mediu suplimentat cu LIF, majoritatea laboratoarelor folosesc stratul hrănitor pentru a menține proliferarea și starea nediferențiată a celulelor stem embrionare. Se folosesc două tipuri de celule hrănitoare: (1) culturi primare de fibroblaste embrionare de șoarece; (2) linia de fibroblaste de șoarece STO.

Fibroblastele embrionare primare de șoarece au avantajul că reprezintă o sursă foarte potentă, sigură și reproductibilă de celule hrănitoare. Dezavantajul este că au durată de viață limitată în cultură și trebuie înlocuite continuu din stocuri congelate. În plus, fibroblastele embrionare primare normale nu pot fi folosite ca celule hrănitoare în timpul selecției cu G418. Acest aspect poate fi evitat prin folosirea în timpul selecției, a unui mediu suplimentat cu LIF sau prin folosirea unei linii de șoarece în care gena *neo^R* este exprimată constitutiv dintr-o transgenă.

Fibroblastele STO aparțin subliniei SIM, fiind rezistente la tioguanină și ouabaină. Au fost folosite pentru cultivarea celulelor teratocarcinoamelor și celulelor stem embrionare. Avantajul folosirii unei linii celulare stabilizate pentru stratul hrănitor este acela că ele cresc ușor și nu necesită înlocuirea din stocuri congelate.

Protocol experimental

1. Se disecă embrionii de șoarece la 12 zile jumătate –14 zile jumătate după împerechere și se plasează într-un vas Petri de 10 cm, ce conține DMEM fără ser.
2. Se îndepărtează membrele, organele interne și creierul sau partea superioară a capului, ce conține creierul pentru a obține "carcase" embrionare.
3. Se plasează carcassele într-un tub conic de 50 ml cu DMEM steril și se spală de trei sau mai multe ori.
4. Se mărunțesc embrionii cu o lamă de ras sterilă până ce au consistență gelatinoasă.
5. Embrionii mărunțiți se plasează în tuburi de 15 ml, cu 10 ml tripsină/EDTA în tampon fosfat salin și se incubează cu agitare la 37°C, 10 minute.
6. Se ia un volum de 5 ml din tubul de tripsinizare și se plasează într-un tub steril de 50 ml, peste un volum egal de DMEM cu 10% ser de vițel nou-născut.
7. Se adaugă încă 5 ml de tripsină/EDTA în tampon fosfat salin la tubul de tripsinizare și se continuă incubarea încă 10 minute. Se ia încă un volum de 5 ml și se adaugă în tubul de 50 ml, cu un volum egal de DMEM cu 10% ser de vițel nou-născut.
8. Se repetă etapa 7 de 5 ori. În final, va rămâne în tubul de 50 ml doar cartilajul insolubil.
9. Se centrifughează conținutul tubului de 50 ml și se resuspendă sedimentul în 50 ml DMEM cu 10% ser de vițel nou-născut.

10. Se însămânțează celulele în plăci Petri de plastic sterile, de 9 cm, cu DMEM plus 10% ser de vițel nou-născut.
11. În următoarea zi se schimbă mediul și se lasă celulele să crească până la confluență. În cultură, în afară de fibroblaste există și alte tipuri celulare (celule nervoase, condrocite), însă acestea nu supraviețuiesc pasajului. Se diluează celulele 1:10 și se permite creșterea la confluență. Când sunt confluențe se congelează fiecare placă.

B. Inactivarea mitotică a fibroblastelor

Se realizează prin două metode: (a) tratamentul cu mitomicină C; (b) iradiere γ . Mitomicina C se leagă de ADN și blochează proliferarea celulară.

Protocol experimental

Tratamentul cu mitomicină C

1. Se incubează celulele STO confluențe sau fibroblastele embrionare de șoarece cu 10 $\mu\text{g/ml}$ mitomicină C, dizolvată în DMEM cu 10% ser de vițel nou născut, 2-3 ore la 37°C.
2. Se spală intens cu tampon fosfat salin și se colectează celulele prin tripsinizare. Se sedimentează celulele prin centrifugare ușoară (1000 rpm, 5 min), se resuspendă sedimentul în DMEM cu 10% ser de vițel nou născut, se numără celulele și se diluează la o densitate finală de $3 \times 10^5/\text{ml}$.
3. Se însămânțează celulele în plăci Petri pretratate cu gelatină (se umplu plăcile de cultură cu 0,1% gelatină și se lasă 2 ore, după care se varsă gelatina și se lasă la uscat). *Acest procedeu crește adezivitatea celulelor hrănitoare la placă.*

Tratamentul cu raze γ

1. Se expun celulele confluențe la raze γ , cu o intensitate de 3.000-10.000 rad.
2. Se recoltează celulele prin tripsinizare, se numără și se plasează pe plăci gelatinizate. Celulele iradiate pot fi congelate la o concentrație de 5×10^6 celule/ml. După dezghețare, 1 ml din această suspensie este plasată în 4-5 plăci de 6 cm.

C. Izolarea celulelor stem embrionare

Tehnica este costisitoare, laborioasă și consumatoare de timp. În condiții de cultivare suboptimale (nutrienți și factori de creștere insuficienți; densitate mare) s-au selectat variante care au suferit rearanjări cromozomiale și/sau mutații care afectează capacitatea de diferențiere. În figura 86 este prezentată o colonie de celule stem embrionare, în care se remarcă creșterea celulelor în grupuri strâns împachetate, cu margini netede. Dacă celulele încep să se împrăștiie pe substrat sau formează colonii cu endoderm rugos pe suprafață, culturile sunt suboptimale.

Pentru cultivarea celulelor stem embrionare se folosește cel mai frecvent mediu Eagle modificat Dulbecco (DMEM) cu 4500 mg/litru glucoză. Opțional se adăugă 1mM piruvat de sodiu.

Majoritatea liniilor de celule stem derivă din linia de șoarece 129. Aceasta este homozigotă A/A la locusul *agouti*. Pentru identificarea himerelor după culoarea blănii, este necesară injectarea celulelor stem embrionare în blastociști de la linii albino sau homozigoți non-agouti (a/a). Dacă celulele stem embrionare sunt de la o linie non-agouti (de exemplu, C57BL/6), blastocistul gazdă trebuie să fie de la o linie albino sau agouti. Nou-născuții agouti și non-agouti pot fi distinși unii de alții la aproximativ o

săptămână după naștere. Din păcate, șoarecii C57BL/6 nu furnizează suficienți blastociști după împerechere naturală.

Așa cum am menționat, majoritatea liniilor de celule stem embrionare au un cariotip XY și din acest motiv există o alterare a raportului între sexe. Deoarece o singură alelă din celulele stem embrionare este modificată prin recombinare omoloagă, doar 50% din progenitura agouti a unui mascul himeric împerecheat cu o femelă non-agouti va moșteni mutația. Femelele și masculii heterozigoți sunt împerecheați pentru a obține 50% heterozigoți, 25% homozigoți normali și 25% embrioni homozigoți transgenici. Dacă mutanții homozigoți mor la scurt timp după naștere, ei sunt mâncați de mame. Pentru a colecta toți nou-născuții se plasează înaintea nașterii o plasă de sârmă la câțiva centimetrii deasupra fundului cuștii. Nou-născuții vor cădea prin ochiurile plasei la fundul cuștii, de unde sunt recoltați.

Protocol experimental

1. Se recoltează embrionii prin spălarea coarnelor uterine cu mediu M2 sau DMEM cu 10% ser și 25 mM HEPES (pH 7,4) și se plasează individual în vase de cultură de 10 mm, ce conțin fibroblaste hrănitoare și 1ml de mediu de cultură. Primul stadiu al culturii embrionare poate fi realizat în picături de mediu, fără celule hrănitoare, sub ulei de parafină. După 1-2 zile de cultură, embrionii ies din zona pellucida și se atașează de suprafața vasului de cultură, prin migrarea celulelor trofoblastice. La scurt timp după atașarea embrionului, masa celulară internă devine vizibilă și crește rapid în următoarele două zile. În mod normal după 1-2 zile, masa celulară internă este considerabil de mare.
2. După 4-5 zile de cultură, grupurile celulare se dislocă de pe stratul de celule fibroblastice. Grupurile de celule care au un strat extern de endoderm, s-au diferențiat prea mult și sunt mai puțin potente pentru generarea celulelor stem embrionare. Se spală grupurile de celule cu două băi de tampon fosfat salin și se transferă celulele într-o picătură de 0,25% tripsină/0,2% EDTA în tampon fosfat salin, sub ulei de parafină.
3. Se incubează în picătură, la 37°C, 3-4 minute. Se umple o pipetă cu mediu ce conține ser (diametrul capătului pipetei nu trebuie să fie mai mare decât grupul de celule). Cu ajutorul pipetei se disociază grupul de celule în agregate mici, de 3-4 celule.
4. Se transferă conținutul picăturii în vase de cultură de 10 mm, tapetate cu strat hrănitor. Se inspectează zilnic cultura. În general, după două zile devin vizibile coloniile primare, care pot avea una din următoarele morfologii: (1) celule tip trofoblastic; (2) celule tip epitelial; (3) celule tip endodermal; (4) celule stem.

Celulele tip trofoblastic apar în cultură în aproape 100% din cazuri. Sunt asemănătoare morfologic cu cele din blastocist. Formează colonii care inițial apar identice ca morfologie cu celulele stem pluripotente. După 1-2 zile, celulele de la periferia coloniei se aplatizează și se împrăstie. În general, în 24 de ore colonia se diferențiază rapid pentru a forma exclusiv celule gigant.

Celulele tip epitelial apar ocazional și formează colonii foarte distincte. Aceste celule cresc foarte greu și formează zone discrete pe stratul hrănitor. Celulele se asociază pentru a forma o structură aplatizată de tip epitelial. Frecvent, capete coloniei sunt foarte refractile.

Celulele tip endodermal formează zone rotunde, refractile, slab atașate. Nu apar în toate culturile.

Celulele stem embrionare cresc progresiv, formează colonii (Fig.86) și mențin un fenotip stabil. Coloniile care nu prezintă nici o diferențiere și rețin un fenotip exclusiv de celule stem embrionare sunt îndepărtate după 7-8 zile de cultură. Acestea sunt disociate cu tripsină/EDTA și pasate în vase de cultură mici, tapetate cu stat hrănitor, pentru a menține densitatea celulară mare. În culturile reușite, după 2-3 zile apar grupuri mici de celule stem. În funcție de viteza de creștere, aceste culturi sunt tripsinizate, conținutul fiind transferat apoi într-un vas de cultură mare, tapetat cu fibroblaste. O linie stabilizată de celule stem necesită pasaj la 2-3 zile.

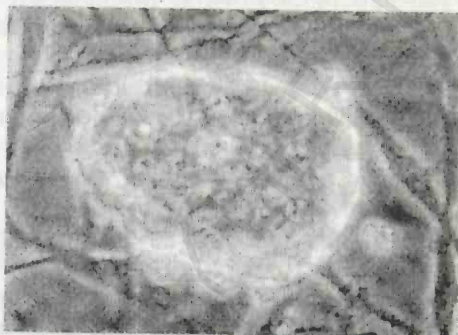


Fig.86. Colonie de celule stem embrionare

D. Electroporarea celulelor stem embrionare

Electroporarea este un proces fizic, care se bazează pe permeabilizarea tranzitorie a membranei plasmatică de către un câmp electric. Fenomenul membranal este reversibil și reprezentat de formarea unui por membranal tranzitoriu numai dacă potențialul transmembranar atinge valori de 0,5-1,5 V. Moleculele sunt transportate prin acești pori prin difuzie sau electro-osmoză (Mansouri, 1998).

Protocol experimental

1. Se folosește o cultură de celule stem embrionare în creștere exponențială. Mediul este schimbat cu trei ore înaintea recoltării celulelor. Se tripsinizează celulele, se adaugă mediu cu ser pentru a inhiba acțiunea tripsinei și se pipetează de mai multe ori cu o pipetă Pasteur, pentru a produce o suspensie monocelulară.
2. Se centrifughează ușor celulele (1000 rpm) și se spală sedimentul celular cu tampon fosfat salin.
3. Se resuspendă aproximativ 10^7 celule stem embrionare în 0,8 ml tampon fosfat salin, cu 25 $\mu\text{g/ml}$ ADN liniarizat. Suspensia se lasă 5 minute la temperatura camerei.
4. Se transferă suspensia într-o cuvă de electroporare, de 0,4 cm. Se verifică să nu existe bule de aer în cuva de electroporare. Se electroporează la o intensitate de 500 μF și 250 V, la temperatura camerei. Se electroporează în paralel celule stem embrionare martor (fără ADN) la aceeași densitate celulară. După acest tratament 50% din celule mor.
5. Repaus 5 minute, la temperatura camerei.
6. Dacă se folosește tehnica de selecție pozitivă-negativă se împart cei 0,8 ml de probă electroporată în cantități egale, în patru plăcuțe de cultură și se lasă celulele 24 de ore în mediu neselectiv.
7. Se însămânțează celulele stem embrionare martor la aceeași densitate celulară.
8. La 24 de ore după electroporare, se aplică mediul de selecție cu G418 sau G418 cu gancyclovir (2×10^6) sau 0,2 μM FIAU. Mediul de cultură se schimbă zilnic.

9. După cinci zile se schimbă mediul de selecție și se cultivă numai în mediu de selecție cu G418. *Selecția cu ganciclovir este necesară doar pentru primele patru zile.*
10. După opt zile se verifică placa martor, care nu trebuie să conțină celule stem embrionare. Coloniile de celule stem embrionare transfectate sunt mari (aproximativ 1000 de celule) și se recoltează. *Nu se lasă coloniile să devină prea mari pentru că ele se diferențiază.*
11. Se culeg clonele de celule stem embrionare. Cu un marker se realizează un cerc sub clona dorită.
12. Se pregătește o placă cu 96 de godeuri, ce conține 40 μ l tripsină/EDTA în fiecare godeu.
13. Operația de colectare a clonelor de celule stem embrionare se realizează la stereomicroscop (în hotă sterilă). Fiecare clonă marcată se culege și se transferă într-un godeu. Într-o singură etapă pot fi manipulate 12-24 clone celulare.
14. După ce coloniile au fost tripsinizate (timp variabil) se transferă cu o pipetă automată multiplă (12 vârfuli), 12-24 clone la o placă cu 24 godeuri, tapetate cu strat hrănitor proaspăt (de o zi) și mediu de cultură pentru celule stem embrionare (1 ml pentru fiecare godeu). Se amestecă bine, se transferă în incubator și se schimbă mediu zilnic. Transferul clonelor din plăcile de 96 de godeuri la placa de 24 de godeuri este realizat folosind o pipetă cu 6 vârfuli (lăsând fiecare al doilea godeu gol). Acest procedeu permite transferul conținutului godeurilor alternative, din placa cu 96 godeuri la cea cu 6 godeuri.
15. În momentul în care celulele sunt confluențe (3-5 zile) se tripsinizează prin adăugarea de 150 μ l tripsină/EDTA la fiecare godeu și se incubează pentru 5 minute, la 37°C.
16. Se adaugă 600 μ l de mediu de cultură la fiecare godeu pentru a opri tripsinizarea și se amestecă bine. Se aspiră 400 μ l din fiecare godeu, se transferă într-o placă cu 24 de godeuri (pentru congelare) și se adaugă celulele rămase din aceeași clonă la altă placă cu 24 de godeuri gelatinizate (fără strat hrănitor), preechilibrate cu 500 μ l mediu de cultură.
17. Se adaugă 400 μ l mediu de congelare (2X) la fiecare godeu și se amestecă pentru omogenizare. Se acoperă cu o pungă de plastic sau hârtie și se congelează la -70°C. Aceasta va constitui placa principală.
18. Toate clonele de celule stem embrionare sunt procesate ca mai sus.
19. Celulele stem embrionare din placa gelatinizată vor fi folosite în momentul în care ajung la confluență pentru a prepara ADN genomic necesar trierii.
20. Clonele culese sunt analizate prin Southern blot. Cele pozitive sunt multiplicare și reverificate.
21. Celulele stem embrionare care au integrat ADN străin de interes sunt folosite pentru a genera himere prin injectarea în blastocist sau agregarea de morule.

E. Identificarea embrionilor sau șoarecilor transgenici homozigoți

Urmărește stabilirea unei linii transgenice homozigote. Aceasta poartă denumirea de linie fondatoare. Se folosesc următoarele metode:

Dozarea transgenei poate fi realizată fie prin Southern blot sau dot-blot pe ADN izolat din coadă.

Testul împerecherii. Deși transmiterea transgenei la 100% din progenitură este testul definitiv al homozigoției, acesta este prea costisitor și consumator de timp pentru a tria un număr mare de șoareci. Cu toate acestea, în unele situații este

important de a confirma homozigotia prin testul împerecherii. Dacă sunt observați prea puțini "homozigoți", testul împerecherii va stabili dacă șoarecii sunt cu adevărat homozigoți. În plus, dacă doi șoareci transgenici homozigoți sunt împerecheați pentru a genera o linie permanentă homozigotă se recomandă confirmarea homozigotiei fiecărui animal prin testul împerecherii, deoarece metodele cantitative pentru identificarea homozigoților pot produce uneori rezultate eronate.

Southern blot folosind regiunea ce flanchează transgena. Dacă ADN gazdă ce flanchează inserția transgenei a fost clonat, poate fi folosită o singură copie a probei ADN de șoarece din regiunea flancatoare pentru a identifica homozigoții prin Southern blot. Dacă este folosită cu o enzimă de restricție corespunzătoare o asemenea probă va detecta două benzi în ADN heterozigot. Șoarecii homozigoți pentru inserția transgenei nu vor avea banda ce reprezintă locusul sălbatic (Hogan și al., 1994).

VII. KNOCK-OUT POST-TRANSCRIPTIONAL

A. Interferența ARN

Termenul de ARNi (RNA interference) a fost introdus de Fire și colaboratori în 1998 pentru a descrie protocolul experimental de blocare post-transcripțională a expresiei genice prin formarea de ARN dublu catenar.

ARNi folosește informația de secvență în ARN dublu catenar (ARNdc) pentru a genera un complex proteină-ARN, ce distruge ARNm corespunzător (Fig.87). Astfel, ARNi este foarte specific și doar genele care au aceeași secvență cu ARN dublu catenar sunt afectate.

ARNi a devenit metoda de genetică inversă dominantă la *C. elegans*, unde blocarea post-transcripțională poate fi inițiată prin trei metode: (1) injectarea ARN dublu catenar; (2) incubarea nematodelor în soluții ce conțin ARN dublu catenar; (3) hrănirea cu *E. coli* producătoare de ARN dublu catenar. Recent, gene de pe cromozomii I și III de la *C. elegans* au fost analizate prin ARNi.

ARNi se desfășoară în două etape. În prima etapă, ARNdc este clivat pentru a furniza ARN de interferență mic (siRNA¹⁸) de 21-23 nucleotide. În a doua etapă, se formează un complex ribonucleoproteic alcătuit din ARN de interferență și un complex proteic. Formarea complexului ribonucleoproteic determină desfacerea ARNi și fragmentul monocatenar rezultat se asociază cu ARNm corespunzător, distrugându-l.

Acest fenomen are loc în mod normal în cursul embriogenezei la nematode, unde ARN temporal mic *lin-4* și *let-4* reglează sincronizarea dezvoltării la *C. elegans*. Gena *lin-4* apare a fi limitată la nematode, în timp ce *let-7* este prezentă la mai multe organisme, însă doar la cele cu simetrie bilaterală (Zamore, 2001).

La *Drosophila* au fost folosite câteva metode pentru a transfera ARN dublu catenar. Metoda cea mai simplă este în culturile celulare. ARNdc adăugat în mediu de cultură, blochează funcția genei în 72 de ore. Această tehnică poate reprezenta un mijloc eficient de elucidare a căilor de traducere a semnalelor și a mecanismelor ARNi.

Deși ARNi în culturile de celule este o tehnică rapidă și relativ ușoară, scopul majorității studiilor de genetică inversă este cel de a determina fenotipurile asociate cu

¹⁸small interfering RNA

pierderea funcției unei gene. În acest sens, la *Drosophila*, s-au elaborat două metode ce folosesc ARNi. Prima se bazează pe microinjectarea embrionilor cu ARNdc.

Dezavantajul major al acestei metode este acela că ARNm maternale și zigotice sunt degradate. De asemenea, rezultatele sunt obținute la câteva zile după injectare.

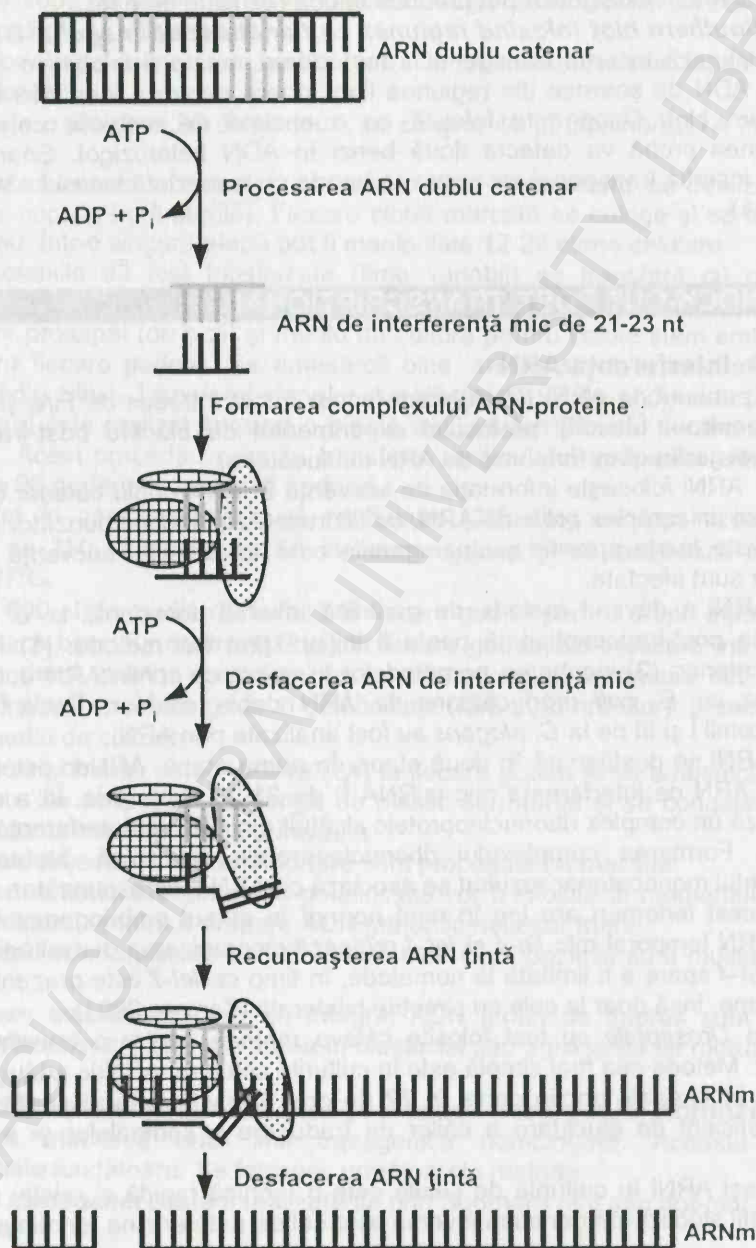


Fig.87. Modelul căii ARNi.

Este de reținut că injectarea ARN dublu catenar nu produce același fenotip la toți embrionii, severitatea fenotipului fiind variabilă. În plus, procedura de injectare poate determina fenotipuri aberante sau moartea unor embrioni. Din păcate, microinjectarea ARNdc în embrionii de *Drosophila* nu interferează eficient cu funcția genei mai târziu în dezvoltare. O metodă alternativă, care poate fi realizată în toate stadiile și în toate țesuturile este aceea de a genera ARNdc *in vivo*. Acest lucru poate fi realizat prin exprimarea unui ARN cu o repetiție inversată lungă, care se poate autoîmpacheta pentru a deveni dublucatenar. În timpul clonării, gazdele bacteriene nu propagă ușor majoritatea secvențelor repetitive inversate, însă stabilitatea acestor secvențe crește semnificativ, dacă repetițiile sunt întrerupte de un spațiator de cel puțin 50 pb (Adams și Sekelsky, 2002).

B. Oligonucleotide antisens - tehnica „morpholino”

Oligonucleotidele antisens se leagă de secvența complementară (denumită secvență țintă) dintr-un anumit ARNm. Această legare împiedică traducerea și în consecință produsul proteic codificat de acel ARNm nu este produs. Există mai multe tipuri de oligonucleotide antisens, cea mai folosită tehnică de acest tip în biologia dezvoltării fiind cunoscută sub denumirea de tehnica „morpholino”. Folosirea oligonucleotidelor antisens ADN în embriologia experimentală a fost limitată datorită efectelor toxice nespecifice și faptului că ARNm degradat este înlocuit prin transcriere, aspect care necesită tratamentul continuu. Există o singură excepție de la această regulă generală reprezentată de studiile genelor maternale în embrionii de *Xenopus*. În acest caz, oligonucleotidele antisens sunt injectate în ovocite, care sunt cultivate câteva zile înaintea fecundării. Oligonucleotidele degradează ARNm țintă dar sunt degradate și ele, astfel încât nu au efecte toxice la embrioni. În plus, în embrionii de *Xenopus* nu există activitate transcripțională până în stadiul de 4000 de celule. Oligonucleotidele antisens morpholino au fost concepute inițial pentru aplicații clinice (Summerton și Weller, 1997) și au fost introduse prima dată în biologia dezvoltării la începutul anului 2000 (Heasman și al., 2000). Ele au fost realizate pentru a depăși limitele oligonucleotidelor ADN.

Oligonucleotidele Morpholino (MO) sunt analogi sintetici de ADN, folosiți pentru țintirea genetică *in vivo*. MO au un inel morpholine, în locul restului de riboză și conțin un schelet încărcat neutru (Fig.88). Cu afinitatea sa pentru ARN, MO servesc ca reactivi antisens excelenți, deși nu recrutează RNaza H și astfel eficacitatea este realizată prin abordări antisens neclasice. MO prezintă toxicitate redusă și nu interferează cu proteine de legare celulare sau nucleaze.

Alterarea procesării transcripționale a nou sintetizaților transcripți (de exemplu, zigotici) este una din abordările pentru țintire genică bazată pe MO (Fig.89). Legarea unei MO antisens la o joncțiune potențială intron/exon poate determina mașinăria de procesare alternativă să omită întregul exon. Această strategie, elaborată pentru aplicații terapeutice poate fi folosită pentru activarea genelor, dacă exonul omis

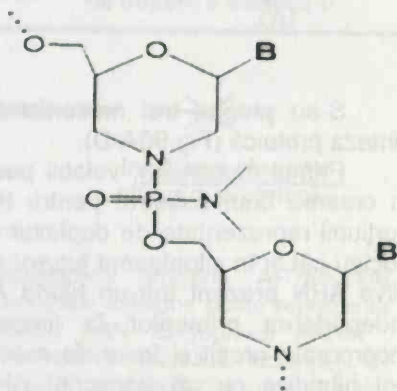


Fig.88. Structura oligonucleotidelor morpholino.

conține o mutație. Această metodă are un avantaj semnificativ, deoarece eficiența procesării alternative poate fi ușor monitorizată folosind PCR sau alte tehnici de analiză ARN.

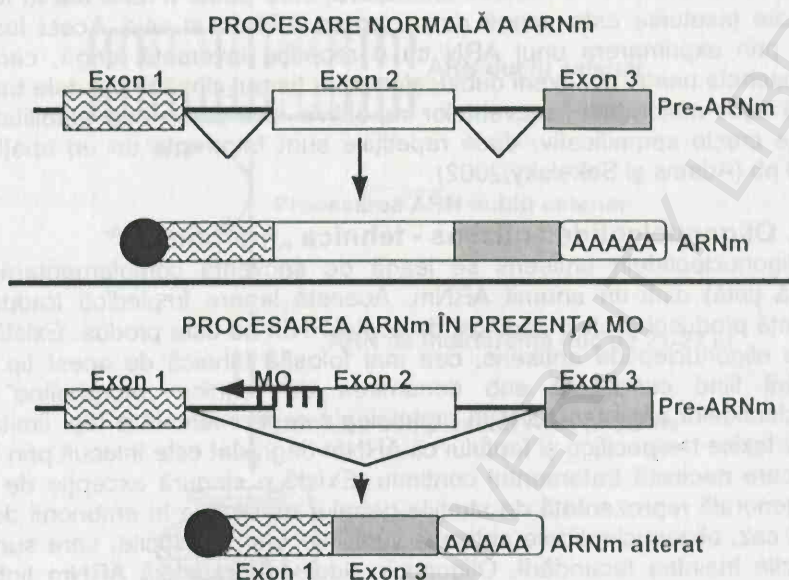


Fig.89. Procesarea normală (A) și alterată (B) a pre-ARNm în prezența MO.

S-au propus trei mecanisme prin care oligonucleotidele antisens blochează sinteza proteică (Fig.90A-D).

Primul mecanism, valabil pentru majoritatea oligonucleotidelor antisens constă în crearea unui substrat pentru RNaza H, ceea ce conduce la clivarea directă a porțiunii reprezentate de duplexul oligonucleotide-ARN. RNaza H se găsește atât în nucleu cât și în citoplasma tuturor celulelor și numele ei derivă de la capacitatea de a cliva ARN prezent într-un hibrid ARN:ADN. În celule, RNaza H poate participa la îndepărtarea primerilor în timpul sintezei ADN, îndepărtarea ribonucleotidelor încorporate greșit și în unele reacții transcripționale. După clivare, oligonucleotidele pot hibridiza cu alt transcript ARN, aspect care crește efectul potențial al unui oligonucleotid antisens (Fig.90B).

În cel de-al doilea mecanism, duplexul ARNm:oligonucleotide împiedică asamblarea complexului ribozomal și implicit traducerea. S-a constatat că atunci când oligonucleotidele formează duplexuri cu ARNm în regiunea 3'UTR sau în apropierea situsului start al traducerii, blochează traducerea. Acest mecanism poate fi valabil pentru MO. MO poate bloca traducerea când are secvențe complementare cu regiunea 5'UTR sau cu primele 25 de baze localizate după situsul start al traducerii (AUG). Datorită faptului că regiunea 5'UTR este mai puțin conservată decât regiunea codificatoare, șansa ca MO să blocheze ARNm nespecific este mai mică decât în cazul oligonucleotidelor antisens tradiționale (Fig.90C). Specificitatea ridicată este

demonstrată și de faptul că traducerea nu este blocată când există câteva nucleotide împerecheate greșit (Heasman,2002).

Al treilea mecanism, presupune că duplexurile oligonucleotide antisens:ARN pot bloca complexul ribozomal angajat în traducere (inhibarea sterică a alungirii), ceea ce conduce la formarea unei proteine incomplete (fig.90D). Până în prezent, majoritatea datelor experimentale susțin primele două mecanisme (Dagle și Weeks,2001).

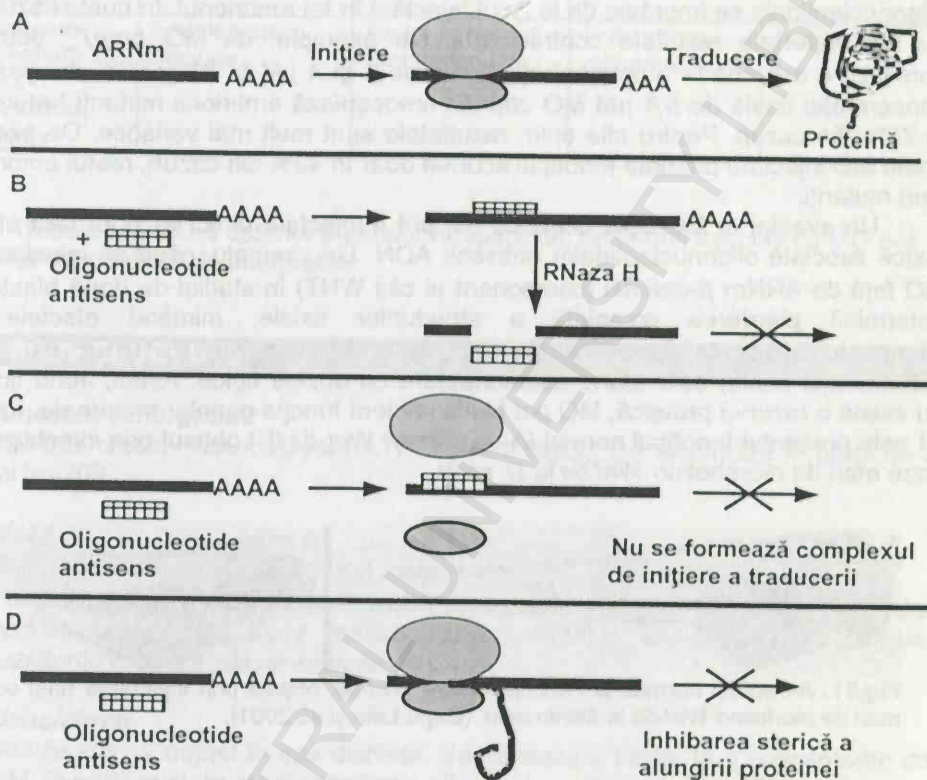


Fig.90. Mecanismele de acțiune ale oligonucleotidelor antisens. **A**-Traducere normală. **B**-Formarea duplexului ARNm : oligonucleotide antisens poate reprezenta substrat pentru RNaza H și conduce la clivarea ARN. **B**-Duplexul ARNm : oligonucleotide antisens poate împiedica asamblarea complexului ribozomal. **C**-Duplexul ARNm : oligonucleotide antisens poate bloca complexul ribozomal angajat în traducere. (Adaptată după Dagle și Weeks,2001).

Tehnica MO a fost folosită cu succes în studiile „knock-down” la *Xenopus laevis*, găină, *D. rerio*, ariciul de mare și *Drosophila*. Pentru embrionii de *D. rerio* și ariciul de mare aceasta este prima metodă viabilă de inactivare genică, specifică de secvență.

Un aspect critic pentru folosirea MO este acela de a mima fenotipurile mutațiilor cunoscute. De o mare importanță în dezvoltarea MO ca tehnică pentru studierea funcției genelor este recunoașterea efectelor toxice pentru a evita confuziile cu cele cauzate de inactivare. Alt aspect critic apare atunci când MO sunt folosite pentru

studierea exprimării genelor în cursul organogenezei. În acest caz trebuie stabilită ce perioadă de timp după injectare blochează traducerea.

Majoritatea experimentelor cu MO au fost realizate pe embrionii de *Danio rerio*, unde sunt disponibile multe mutante care definesc rolul genelor în cursul dezvoltării. La pești, în general oligonucleotidele sunt injectate în sacul vitelin, în citoplasma zigotului sau a embrionilor cu 2-4 blastomere. Injectarea unui MO complementar cu ARNm *gfp* reduce exprimarea proteinei GFP în toate celulele, ceea ce indică că oligonucleotidele se împrășie de la locul injectării în tot embrionul. În unele cazuri însă au fost raportate rezultate contradictorii. De exemplu, un MO *bmp7*¹⁹ determină dorsalizare extremă la o concentrație finală de 1 și 4 μM în 81 și 93% din cazuri. O concentrație finală de 5,4 μM MO *chordin* fenocopiază embrionii mutanți heterozigoți în 75% din cazuri. Pentru alte ținte, rezultatele sunt mult mai variabile. De exemplu, unele MO injectate prezintă fenotipul scontat doar în 43% din cazuri, restul embrionilor fiind mutanți.

Un avantaj al MO este acela că ele pot fi injectate direct în zigot fără efectele toxice asociate oligonucleotidelor antisens ADN. De exemplu, când se injectează un MO față de ARNm β -*catenin* (component al căii WNT) în stadiul de două blastomere determină pierderea completă a structurilor axiale, mimând efectele unui oligonucleotid injectat în ovocit. Doza eficientă în acest caz (5-10 ng; 0,6-1,2 μM concentrație finală) este foarte asemănătoare cu dozele tipice. Astfel, atâta timp cât nu există o rezervă proteică, MO pot bloca eficient funcția genelor maternale. În figura 91 este prezentat fenotipul normal (A) și mutant *Wnt-5a* (B) obținut prin injectarea unei doze mari de morpholino *Wnt 5a* la *D. rerio*.



Fig.91. A-Fenotip normal. B-Fenotip mutant *Wnt-5a*, obținut prin injectarea unei doze mari de morpholino *Wnt-5a* la *Danio rerio*. (După Lele și al.,2001).

Dozele mari de MO determină efecte nespecifice. Acestea includ la pești, apoptoză generalizată, defecte ale epiboliei și degenerarea tubului nervos, efecte care nu apar în cazul mutantelor la care gena respectivă este inactivată. La amfibieni anomaliile includ microcefalie, reducerea anterioară sau posterioară a corpului, segmentare încetinită, dezvoltare întârziată și apoptoză generalizată. În unele cazuri, efectele specifice și nespecifice pot fi recunoscute prin folosirea unor martori corespunzători. La pești și amfibieni se folosesc următorii martori: (1) injectarea altor MO; (2) injectarea unui oligonucleotid MO nonsens; (3) injectarea unui MO inversat sau un MO cu secvențe necomplementare.

Folosirea MO la *Xenopus laevis* este îngreunată de allotetraploidie. În acest caz există două copii ale genei de interes, cu secvențe codificatoare foarte asemănătoare dar cu diferențe semnificative în 5'UTR. Astfel, pentru a ținti ambele ARNm se realizează MO complementare regiunii codificatoare la situsul start sau se construiesc două MO. Din acest punct de vedere, specia înrudită *Xenopus tropicalis*, care are un genom diploid este mai potrivită pentru MO.

¹⁹bone morphogenetic protein, proteină morfogenetică osoasă

Oligonucleotidele antisens sunt furnizate embrionilor prin electroporare și microinjectare (Tabel 5). Vizualizarea directă poate fi realizată prin folosirea FITC sau altui marker legat direct de MO (Egger și Larson, 2001).

Tabel 5. Strategii de injectare a MO la diferite specii

	<i>Drosophila</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Gallus</i>	<i>Xenopus</i>
Modul de administrare	Microinjectare	Microinjectare	Electroporare	Microinjectare
Perioada embrionară în care s-a demonstrat eficiența	Embriogeneza timpurie	Pe tot parcursul embriogenezei	În timpul somitogenezei	Neurulare

Trebuie reținut că datorită efectelor nespecifice, embrionii injectați cu MO pot avea fenotipuri dificil de interpretat.

VIII. MEDII ȘI SOLUȚII

■ Amestec „energetic”

150 mM creatin fosfat; 20 mM ATP; 20 mM $MgCl_2$. Se stochează în porții de 0,1 ml la $-20^{\circ}C$.

■ G418

Soluție stoc: 20 mg/ml în tampon fosfat salin.

Soluție de lucru: 50-200 $\mu g/ml$. Înaintea experimentului se stabilește concentrația optimă, la care mor toate celulele martor și rămân numărul maxim de colonii rezistente după 14 zile de selecție.

■ Ganciclovir

Soluție stoc: 2 mg/ml în apă distilată. Se diluează o parte, la o concentrație de 2 mM, în porții mici, se sterilizează prin filtrare și se stochează la $-20^{\circ}C$.

Soluție de lucru: Se diluează la o concentrație de 2 μM cu mediu de cultură.

■ 1% gelatină

Soluție stoc: 1 g gelatină (Tip A, din tegument bovin, Sigma) la 100 ml apă distilată. Se autoclavează și se stochează în porții de 20 ml la temperatura camerei.

Soluție de lucru 0,1%: 10 ml 1% gelatină + 90 ml tampon fosfat salin.

■ HCG

1000 U.I./ml în apă. Stocare la $4^{\circ}C$.

■ Hoechst 33342

Soluție stoc: 10 mg/ml în apă distilată. Se stochează ferită de lumină la $-20^{\circ}C$.

Soluție de lucru: se diluează soluția stoc 1 : 100 cu apă distilată.

■ **Lizolecitină**

Soluție stoc: 10 mg/ml L α -lizofosfatidilcolină (Sigma Tip I). Soluția stoc se păstrează la -20°.

Soluție de lucru: 100 μ l din soluția stoc. Se dizolvă la temperatura camerei înainte de folosire.

■ **Mediu pentru celule stem embrionare**

DMEM (4,5 g/litru glucoză); 10^{-4} M β -mercaptoetanol; 2 mM glutamină; 1% soluție stoc de aminoacizi neesențiali; 1 mM piruvat de sodiu; 15% ser fetal de vițel (inactivat la 56°C, 30 minute); 500 U/ml LIF. Pentru a realiza 500 ml, se adaugă la DMEM: 5 ml glutamină; 5 ml aminoacizi neesențiali; 5 ml piruvat de sodiu; 5×10^5 unități LIF; 0,5 ml β -mercaptoetanol; 89 ml ser fetal de vițel. Se stochează la 4°C.

■ **Mediu de congelare pentru celulele stem embrionare**

10% DMSO în DMEM, cu 20% ser fetal de vițel.

■ **β -mercaptoetanol**

Soluție stoc: 35 μ l 14 M β -mercaptoetanol; 5 ml tampon fosfat salin. Se amestecă bine și se sterilizează prin filtrare. Se stochează ferit de lumină (recipientul acoperit cu folie de aluminiu) la 4°C, până la o săptămână.

■ **Mitomycină C**

Soluție stoc: 2 mg/ml mitomicină C în 2 ml tampon fosfat salin. Se sterilizează prin filtrare.

Soluție de lucru: Se diluează soluția stoc cu mediu pentru fibroblaste embrionare (DMEM + 10% ser fetal de vițel), la o concentrație de 100 μ g/ml și se stochează în porții de 25 ml, la -20°C.

■ **Plasmidă liniarizată pentru obținerea de amfibieni transgenici**

200-250 ng/ μ l. Plasmida ADN poate fi eluată cu apă distilată sau tampon Tris-EDTA. Plasmida este liniarizată în special cu *Xba*I sau *Not*I. Enzima liniarizată este purificată folosind kitul GeneClean (Bio 101, Inc). Dacă plasmida liniarizată trebuie concentrată se realizează precipitare standard cu 0,1 volume acetat de sodiu (din stoc 3M; pH 5,2) și 2,5 volume etanol absolut, urmată de o spălare cu etanol 70%.

■ **PMSG**

100 U./ml în apă distilată. Stocare la -20°C.

■ **Soluție Ringer modificată de Marc**

Soluție stoc 10X: Se amestecă 58,4 g NaCl și 12 g HEPES. Se adaugă apă până la 700 ml și se ajustează pH-ul la 7,6. Se adaugă 1,5 g KCl; 2,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g EDTA. Se aduce la 1 litru. Se sterilizează prin filtrare și se stochează la frigider câteva luni. Se aduce la temperatura camerei înainte de folosire.

Soluție stoc antibiotice 200X: 10 mg/ml gentamicină. Soluția se sterilizează prin filtrare și se stochează la -20°C. Se adaugă în mediu la o concentrație de 50 μ g/ml.

■ *Soluție salină Hank*

0,4 g KCl; 0,06 g KH_2PO_4 ; 8 g NaCl; 0,062 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Se autoclavează soluția 30 minute, la 120°C și se reajustează volumul cu apă sterilă. Se păstrează la 4°C până în momentul folosirii.

■ *Soluție Tyrode acidă*

0,8 g NaCl; 0,02 g KCl; 0,024 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,01 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g glucoză; 0,4 g polivinilpirolidonă.

■ *Tampon diluare spermatozoizi*

Soluții stoc: 10 mM spermidine trihydrochloride. Se sterilizează prin filtrare și se stochează în porții mici la -20°C .

10 mM spermine tetrahydrochloride. Se sterilizează prin filtrare și se stochează în porții mici la -20°C .

100 mM dithiothreitol. Se sterilizează prin filtrare și se stochează în porții mici la -20°C .

0,5 M EDTA, pH 8.

Soluție de lucru: 250 mM zaharoză; 75 mM KCl; 1 mM EDTA (din stoc 0,5 M, pH 8); 0,5 mM spermidine trihydrochloride (din stoc 10 mM); 0,2 mM spermine tetrahydrochloride (din stoc 10 mM); 1 mM dithiothreitol (din stoc 100 mM). Tamponul se stochează la -20°C , în porții de 0,5 ml.

■ *Tampon de extracție ovocitar*

Soluție stoc 20X: 2M KCl; 20 mM MgCl_2 ; 2 mM CaCl_2 . Sterilizare prin filtrare și stocare la 4°C .

Soluție de lucru: 100 mM KCl; 0,1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2 (din soluție stoc 20X); 50 mM zaharoză (din soluție stoc 1,5 M, sterilizată prin filtrare și păstrată în porții mici, la -20°C); 10 mM HEPES (din soluție stoc 1 M, titrată cu KOH, astfel încât pH-ul să fie 7,7, când este diluat la 10 mM; sunt necesari ~5,5 ml de 10 N KOH pentru 100 ml; se sterilizează prin filtrare și se stochează la -20°C). Se prepară 100 ml de tampon de extracție 1X.

■ *Tampon de extracție - CSF*

1X tampon de extracție (100 mM KCl; 0,1 mM CaCl_2 ; 1 mM MgCl_2); 1 mM MgCl_2 (în plus față de cel prezent în tamponul de extracție; concentrația finală 2 mM); 10 mM HEPES, pH 7,7; 50 mM zaharoză; 5 mM EGTA, pH 7,7. Se prepară 50 ml.

■ *Tampon fosfat salin*

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 ; 500 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul cu HCl, după care se aduce la 1000 ml cu apă distilată. Când se folosește pentru cultura de celule pH-ul este 7,2. Pentru alte scopuri pH-ul este 7,4.

■ *Tampon nuclear*

Soluții stoc: 1,5 M zaharoză, sterilizată prin filtrare și stocată la -20°C , în porții mici.

1 M HEPES. Sterilizare prin filtrare și stocare în porții mici, la -20°C .

Diluarea soluției stoc modifică drastic pH-ul. Se aduce la pH 7,7 în momentul diluării.

10 mM spermidine trihydrochloride. Se sterilizează prin filtrare și se

stochează în porții mici la -20°C .

10 mM spermine tetrahydrochloride. Se sterilizează prin filtrare și se stochează în porții mici la -20°C .

100 mM dithiothreitol. Se sterilizează prin filtrare și se stochează în porții mici la -20°C .

Soluție de lucru: 250 mM zaharoză; 15 mM HEPES; 0,5 mM spermidine tetrahydrochloride; 0,2 mM spermine tetrahydrochloride; 1 mM dithiothreitol. Pentru fiecare experiment este mai convenabil să se realizeze 30 ml de tampon nuclear stoc 2X. Se folosește apoi acest stoc 2X pentru a realiza toate celelalte soluții.

Pentru etapele în care sunt necesari inhibitori proteazici se adaugă: 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin (din stoc 10 mg/ml în DMSO, păstrat în porții mici, la -20°C), 0,3 mM PMSF (din stoc 0,3 M în etanol, păstrat la -20°C).

■ **Tripsină - EDTA**

Pentru detașarea celulelor din plăcuțele de cultură și pentru disocierea celulelor unele de altele se folosește: 0,05% tripsină, 0,02% EDTA în tampon fosfat salin.

Pentru cultura de celule stem embrionare și disocierea coloniilor după selecție se folosește: 25% tripsină; 0,04% EDTA; în soluție Hank.

CAPITOLUL

3

METODE DE ANALIZĂ A DESCENDENȚELOR CELULELOR EMBRIONARE

Zigotul se dezvoltă într-un organism pluricelular printr-o serie de procese, ce includ diviziuni, interacții, migrări, rearanjări celulare și apoptoză. Pentru înțelegerea modului în care au loc aceste procese în embrion, se construiesc "hărți embrionare", care ne arată destinul blastomerele timpurii și structurile pe care le generează. La organisme transparente de tipul *Caenorhabditis elegans*, numărul de celule este suficient de mic pentru observarea directă a diviziunilor celulare. La speciile unde numărul de celule este mare au fost elaborate tehnici specifice (Tabel 6).

Pentru urmărirea descendenței¹ unor blastomere, acestea se marchează la începutul embriogenezei, pentru ca ulterior să se stabilească teritoriul embrionar format de descendenții celulei/celulelor marcate. Prin urmărirea descendențelor tuturor blastomerele timpurii se alcătuiește în final o hartă embrionară. Hărțile embrionare stau la baza embriologiei experimentale, deoarece furnizează cercetătorilor informații despre teritoriile embrionare, care generează anumite structuri larvare sau adulte.

Prin stabilirea originii precise a diferitelor țesuturi se pot elucidă mecanismele care controlează organizarea planului corporal, înțelegerea mișcărilor morfogenetice și testarea influenței produșilor exogeni.

Hărțile destinului blastomerele descriu doar calea embrionară pe care o urmează o celulă într-un embrion normal, însă nu se pot face referiri la întregul potențial embrionar al unei celule și nici la momentul sau mecanismele prin care este determinat destinul celular. Destinul exprimat de o celulă este influențat de un număr mare de factori, ce pot include determinanți maternali, interacții intercelulare, factori de creștere sau poziția într-un câmp morfogenetic.

La amfibieni, primele hărți embrionare au fost realizate prin aplicarea unor spoturi mici de coloranți vitali (Albastru de Nile) pe embrion și urmărirea celulelor marcate în cursul dezvoltării. Prin această metodă de "pictare" a embrionilor s-au identificat celule care dau naștere endodermului, ectodermului, plăcii neurale și mezodermului. Detaliile acestor hărți au fost mult timp confuze, deoarece nu s-a realizat că fiecare specie de amfibieni are aranjamente celulare ușor diferite. În

¹Înțelegem prin descendență embrionară totalitatea celulelor care derivă în cursul embriogenezei dintr-o blastomere inițială, cunoscută sub denumirea de celulă fondatoare.

blastula de *Xenopus* de exemplu, folosirea coloranților vitali a arătat că celulele care vor da naștere mezodermului se găsesc în jurul regiunii ecuatoriale, sub stratul extern de blastomere, în timp ce studiile realizate pe triton au sugerat că mezodermul este generat de celulele de pe suprafața blastulei. Localizarea mezodermului în interiorul blastulei de *Xenopus* a fost confirmată prin colorarea vitală în stadiul de blastulă a întregului strat superficial de celule. Embriunii au fost lăsați să se dezvolte până în stadiul de gastrulă, după care au fost fixați, incluși în parafină, secționați și observați la microscop. S-a demonstrat în acest fel că celulele superficiale generează epidermă, placa neurală și endoderm.

Tabel 6. Tehnici pentru generarea hărților embrionare

Metoda	Avantaje	Dezavantaje
Vizualizare directă	Non-invazivă; observație continuă	Se poate realiza doar în cazul organismelor transparente, foarte simple sau a explantelor de țesut în cultură
Himere găină-prepelită	Permanente; rezoluție excelentă	Marchează un număr relativ mare de celule; necesită intervenție chirurgicală; există unele diferențe interspecifice
Coloranți lipofilici fluorescenți (Dil, DiO)	Tehnologie redusă; aplicare ușoară prin injectare sub presiune sau ionoforeză	De obicei marchează multe celule; sunt diluați în cursul diviziunilor celulare
Coloranți intracelulari fluorescenți sau ne fluorescenți (dextrani cuplați cu fluorocromi, HRP)	Pot urmări descendența unei singure celule; cea mai bună rezoluție; pot ținti celule specifice	Tehnologie medie; necesită echipament de injectare intracelulară; nu este o tehnică ușoară pentru celule profunde sau mici; de obicei marchează multe celule; sunt diluați în cursul diviziunilor celulare
Coloranți fluorescenți fotoactivabili	Permit țintirea unei singure celule sau a celulelor mici, profunde	Tehnologie înaltă; necesită microscop cu laser; nepermanenți; nu au fost testați foarte mult
Injectarea intracelulară a genelor raportoare	Facilă pentru celule mari; se pot folosi construcții <i>gfp</i> pentru monitorizare continuă	Dificil tehnic pentru celule mici; se diluează în cursul diviziunilor celulare și se degradează; nepermanentă
Transfecție retrovirală	Permanentă; poate urmări descendența unei singure celule; se pot folosi construcții <i>gfp</i> pentru monitorizare continuă	Transfecția inițială întâmplătoare și astfel dificil de țintit celule specifice
Recombinare <i>lacZ</i>	Regiunile promotor specifice de țesut pot direcționa recombinația în anumite celule; permanentă; poate urmări descendența unei singure celule la șoarece	Necesită generarea liniilor transgenice
Recombinare <i>cre/lox</i>	Regiunile promotor specifice de țesut conduc exprimarea <i>cre</i> ; poate fi folosită pentru inițierea exprimării unui construct raportor	Necesită generarea liniilor transgenice

(Adaptat după Clarke și Tickle, 1999)

Prima hartă embrionară a membrilor de găină a fost realizată foarte simplu, prin introducerea în mugurii membrilor a unor bucăți mici de carbon, cerneală sau fire de argint.

Aceste metode au doar valoare istorică, în prezent fiind folosite următoarele tehnici: (1) marcarea cu trasori; (2) transplantarea celulelor embrionare; (3) realizarea de himere; (4) metode genetice.

I. MARCAREA CU TRASORI

Această tehnică permite identificarea precisă a unei populații de celule, cu alterarea minimă a contactelor celulare. Marcarea *in situ* implică injectarea intracelulară sau extracelulară a unui trasor. **Trasorul** reprezintă o moleculă exogenă care după introducerea într-un organism sau într-o celulă poate fi detectat la nivelul microscopiei optice, microscopiei de fluorescență sau în microscopia electronică. Dezavantajul major al marcării *in situ* este acela că trasorii sunt diluați în cursul diviziunilor celulare sub sensibilitatea de detectare.

Injectarea trasorului se face în funcție de tipul de embrion. Au fost descrise două tipuri de injectări: (1) injectare prin presiune; (2) injectare ionoforetică.

Injectarea prin presiune este folosită în cazul blastomereilor mari, de tipul celor de amfibieni. Se realizează prin presiunea aerului sau apei. Pentru injectarea în embrionii relativ tineri, vârful pipetei nu trebuie să fie prea subțire. Injectarea unui număr mare de embrioni se realizează cu ajutorul micromanipuloarelor.

Injectarea ionoforetică se practică la embrionii cu blastomere mici, de tipul celor de la păsări și mamifere. Se folosesc pulsuri de curent electric pentru a conduce electrolitul încărcat în celulă, fără creșterea apreciabilă a volumului.

Succesul injectării depinde de doi parametri: (1) volumul injectat; (2) concentrația trasorului.

Volumul injectat în ovocite, zigoti sau embrioni cu două blastomere poate să fie mai mare de 10 nl, însă pentru stadiile mai avansate se preferă un volum de injectare de 1nl/blastomeră. Deși unele laboratoare au raportat injectarea a 4-10 nl de ARNm în fiecare blastomeră, a unui embrion de două celule, aceste volume sunt toxice în cazul trasorilor enzimatici și fluorescenți. De asemenea, după stadiul de două blastomere, volumele mari de injectare nu sunt tolerate de celule și pot determina artefacte. În general, injectarea a mai mult de 10 nl de trasor într-una din celulele unui embrion cu 16 blastomere poate modifica destinul celular (descendența epidermală poate fi convertită în creier).

Concentrația injectată este de asemenea un parametru important. Concentrația trasorului trebuie să fie destul de mare pentru a fi vizibil, fără să inhibe însă dezvoltarea normală. La amfibieni se folosesc următoarele concentrații: 1% dextran cuplat cu fluoresceină, 0,5% dextran cuplat cu Texas red, 1% dextran cuplat cu rodamină, 5% HRP, 300-500 pg/celulă ARNm β -galactozidază sau ARNm *gfp*. Dextranii cuplați cu fluorocromi sunt dizolvați în 0,2 M KCl (pH 6,8), HRP în apă distilată sterilă și ARNm în tampon Tris-HCl cu EDTA și fără RNază.

Multe laboratoare microinjectează embrionii cu o soluție de 3-5% Ficoll, pentru a preveni dispersarea trasorului prin punctul de injectare. Nu se folosește Ficoll dacă ulterior trebuie îndepărată anvelopa vitelină. Ficoll-ul extrage lichidul perivitelin, astfel încât membrana vitelină aderă de blastomere și nu mai poate fi îndepărtată manual.

Deși moleculele trasor nu sunt citotoxice, atunci când sunt injectate într-o concentrație sau volum mare pot inhiba dezvoltarea normală sau celula injectată nu

se mai divide. Efectele citotoxice ale trasorilor pot fi evaluate după forma și aspectul celulelor injectate sau a descendenților lor. Se pot întâlni următoarele situații: (1) la scurt timp după injectare există celule mari înconjurate de celule mici; (2) când mitoză este blocată mai târziu în cursul embriogenezei, celulele marcate sunt mai mari decât cele normale; (3) celula marcată rămâne sferică și nu se diferențiază. Acest aspect se poate întâmpla la întreaga clonă sau la un grup de celule. Adesea, aceste celule migrează în regiunile embrionare corecte, dar nu se diferențiază; (4) acumularea celulelor marcate în spațiile embrionare (canalul central și ventriculii cerebrali, lumenul tubului digestiv și cavitățile inimii). Aceste celule alterate disociază probabil de restul embrionului în timpul mișcărilor morfogenetice, care au loc în cursul gastrulării. Apariția oricărei situații descrise mai sus determină anularea experimentului și injectarea unui volum mai mic sau a unei concentrații mai scăzute de trasor în următorul experiment.

În funcție de mecanismul de acțiune, trasorii se împart în trei categorii: (1) trasori intracelulari; (2) trasori lipofilici fluorescenți; (3) trasori fluorescenți fotoactivabili.

A. Trasori intracelulari

Pentru ca o moleculă să îndeplinească rolul de trasor intracelular pentru studierea descendențelor celulare trebuie să îndeplinească următoarele condiții: (1) să nu fie toxică; (2) să nu influențeze destinul embrionar al celulei marcate; (3) să fie suficient de mică pentru a difuza rapid din celula injectată în celulele fiice, rezultate din diviziune; (4) să fie suficient de mare pentru a nu trece prin joncțiunile "gap" dintre blastomerele adiacente; (5) să poată fi detectată pe tot parcursul dezvoltării; (6) să nu fie diluată în cursul diviziunilor celulare sau degradată intracelular; (7) să poată fi detectată ușor prin proceduri histologice simple; (8) să nu afecteze celula în momentul injectării (Moody, 1999).

Toate aceste criterii sunt îndeplinite de trei clase de molecule: (1) peroxidaza din hrean (HRP); (2) dextrani cuplați cu fluorocromi; (3) ARNm sau ADNc.

Marcarea descendențelor celulare depinde de momentul injectării trasorului (Fig.92). De exemplu, dacă trasorul este injectat într-o blastomeră a unui embrion la începutul dezvoltării, el va fi identificat în diferite țesuturi. Când injectarea se realizează mai târziu (gastrulă) distribuția trasorului este limitată la un țesut (de exemplu, notocord). Dextranii cuplați cu fluorocromi și HRP pot fi injectați într-o singură blastomeră și descendența marcată urmărită pe parcursul a 10 diviziuni celulare.

La mamifere, blastomerele timpurii pot fi marcate, însă datorită diluării trasorului, descendențele rezultate nu pot fi urmărite dincolo de implantare. La *Danio rerio* injectarea unei singure blastomere este dificilă, datorită dimensiunii mici, a prezenței punților citoplasmice dintre blastomerele timpurii și a sacului vitelin. Amfibienii sunt ideali pentru testarea potențialului embrionar al blastomerelor timpurii. Ei au embrioni foarte mari (1-2 mm diametru), cu blastomere mari, ușor de manipulat. În timpul segmentării, blastomerele aderă în principal prin molecule dependente de calciu, aspect care permite izolarea ușoară a unei singure celule. Amfibienii se dezvoltă foarte rapid, datorită absenței fazelor G ale mitozei. Acest comportament împiedică diluarea trasorului pe parcursul dezvoltării. Embrionii injectați cu trasori enzimatici pot fi menținuți în condiții normale de laborator, în timp ce cei injectați cu trasori fluorescenți sunt crescuți la întuneric, pentru a împiedica fotodecolorarea trasorului.

Peroxidaza din hrean (HRP²) este o oxidoreductază, hemoproteină de origine vegetală, cu o greutate moleculară de 44 kDa și un diametru de 5 nm. Pentru localizarea trasorului, activitatea peroxidazică poate fi demonstrată prin incubarea embrionilor cu substratul, reprezentat de apa oxigenată și un reactiv donor de electroni - 3,3'-diaminobenzidină (DAB). La locul reacției enzimice se formează un precipitat insolubil, de culoare maro. La broască, enzima nu este recunoscută de compartimentul lizozomal embrionar până în stadiul de mormoloc târziu.

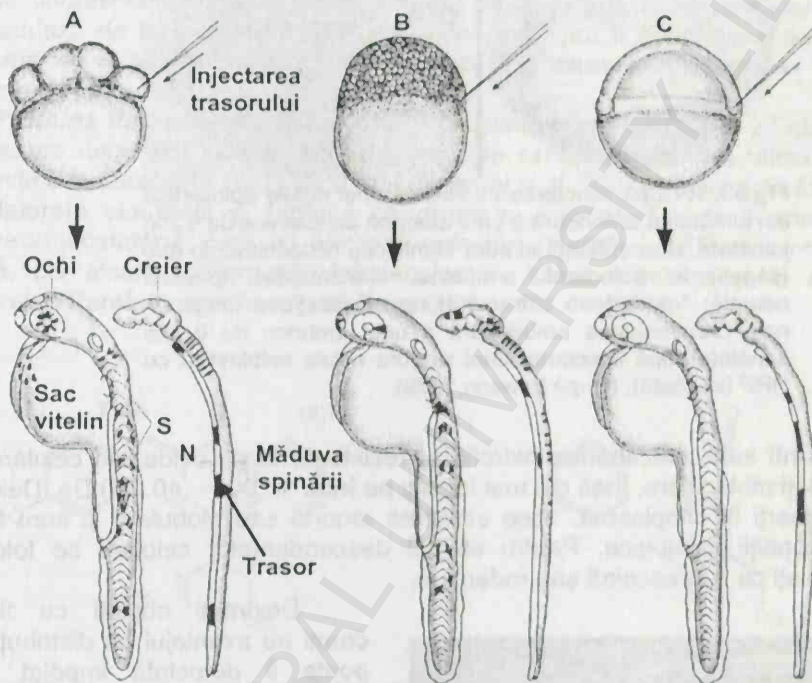


Fig.92. Distribuția trasorilor în embrioni depinde de momentul injectării. **A-**Injectare într-o blastomeră, la începutul segmentării. **B-**Injectare la sfârșitul segmentării. **C-**Injectare la începutul gastrulării. Experimentele sunt realizate la *D. rerio*. N-notocord. S-somite.

Trasarea descendențelor embrionare cu HRP a fost inițiată în anul 1978 de către Weisblat și colaboratori, care au injectat-o la hidră, la începutul dezvoltării embrionare, într-o celulă mare numită teloblast. Enzima a trecut în forma catalitică activă la toți descendenții celulei injectate și a fost detectată ulterior, pe secțiuni sau în larve *in toto*, folosind un substrat cromogen. Rezultatele au demonstrat că fiecare teloblast este o celulă stem, ce contribuie la un anumit teritoriu embrionar. Metoda cu HRP a fost adaptată rapid și la embrionii vertebratelor (Fig.93).

Există câteva dezavantaje ale folosirii trasorilor enzimatici pentru studiul descendențelor celulare. Deoarece embrionul trebuie fixat și colorat pentru a detecta enzima, metoda este limitată la distribuția descendenților unei celule fondatoare într-

²Horseradish peroxidase

un singur stadiu embrionar. Metodele de detectare enzimatică sunt laborioase și în cazul HRP necesită folosirea unor substraturi toxice, carcinogene (DAB).

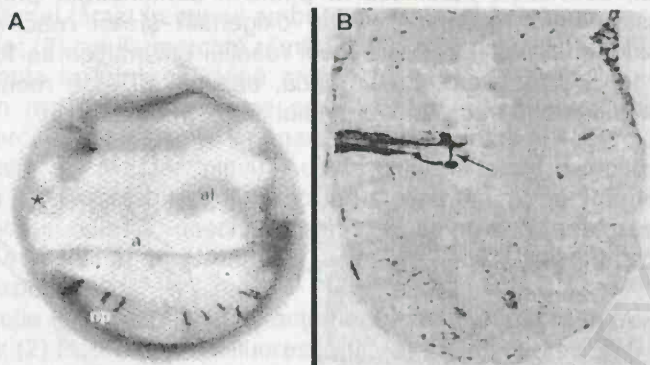


Fig.93. A-După injectarea cu HRP a unei celule epiblastice din jumătatea anterioară a unui embrion de șoarece de 6 zile jumătate, descendenții ei sunt identificați histochimic *in toto* (săgeți) în ectoderm. a-amnios; al-alantoida, np-placa neurală; *-endoderm extraembrionar. B-Sețiune longitudinală prin regiunea embrionară a unui embrion de 6 zile jumătate după injectarea unei singure celule epiblastice cu HRP (săgeata). (După Lawson,1999).

Dextranii sunt polizaharide hidrofiliice, rezistente la glicozidazele celulare. Au diferite greutăți moleculare, însă cei mai folosiți au între 10.000 – 40.000 Da. Dextranii sunt relativ inerti în citoplasmă, au o structură amorfă sau globulară și sunt foarte solubili în condiții fiziologice. Pentru studii de descendențe celulare se folosesc dextranii cuplați cu fluoresceină sau rodamină.

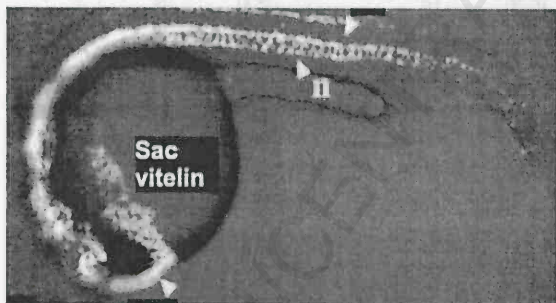


Fig.94. După injectarea de dextran-FITC într-un embrion de *D. rerio* de patru celule, trasorul este identificat, *in toto*, în stadiul de larvă, în notocord (n) și mezodermul cranial (cap de săgeată). (După Shih și Fraser,1996).

Dextranii cuplați cu fluorocromi au avantajul că distribuția lor poate fi detectată imediat după microinjectare, astfel încât celulele marcate inițial pot fi identificate și numărate. Acest aspect este important, deoarece celulele fiice pot rămâne cuplate prin punți citoplasmice. Dacă lumina de excitație fluorescentă este păstrată la minim, trasorii fluorescenți pot fi observați la diferite intervale de timp în embrionii vii. Cu toate acestea, în puține cazuri au permis descrierea completă a descendenței unei celule și observarea detaliată a migrărilor celulare *in situ*.

Embrionii injectați cu dextrani cuplați cu fluorocromi trebuie analizați imediat la microscopul cu epifluorescență sau microscopul de fluorescență confocal (Fig.94). În acest scop embrionii sunt fixați sau observați ca atare. Excitația fluorocromilor eliberează radicali liberi, care pot distruge

celulele vii. Din acest motiv este mai bine ca observarea embrionilor să se facă foarte rapid sau în condiții de luminozitate scăzută. Trasorii fluorescenți pot fi extrem de rezistenți dacă probele sunt stocate în întuneric, la frigider sau înghețate. Embrionii marcați cu dextrani cuplați cu fluorocromi pot fi stocați până la un an, fără diminuarea semnalului (Ruitz I Altaba și al., 1993).

Dezavantajul acestor trasori este acela că intenția de a microinjecta o singură blastomeră conduce adesea la marcarea a două sau mai multe celule.

Moleculele de **ARNm** sau **ADNc** folosite ca trasori codifică β -galactozidaza și proteina fluorescentă verde (GFP³). Ambele proteine provin de la nevertebrate, β -galactozidaza de la bacterii și GFP de la meduze, pot fi diferențiate de proteinele endogene ale vertebratelor, sunt prea mari pentru a difuza prin joncțiunile "gap" și nu au efecte adverse asupra celulelor vertebratelor.

Proteina fluorescentă verde este o proteină monomerică, de 27-kDa, extrasă din meduza *Aequorea victoria*. Atunci când este excitată cu lumină ultravioletă (395 nm) emite o fluorescență verde (509 nm) (Spergel și al., 2001). Avantajele folosirii GFP sunt datorate stabilității și faptului că gruparea cromoforă este formată printr-o ciclizare autocatalitică, care nu necesită cofactori (Fig.95). GFP este rezistentă la căldură, pH alcalin, detergenți, fotodecolorare, săruri organice și la majoritatea proteazelor. Paraformaldehida nu distruge GFP.

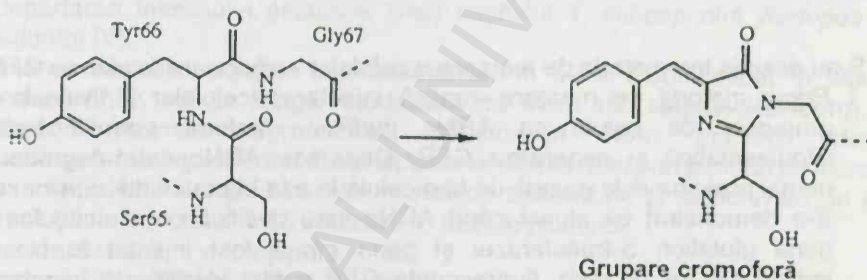


Fig.95. Formarea grupării cromofore din GFP. (După Wilson și Hastings, 1998).

La meduză, lumina este produsă când energia este transferată de la aequorin la GFP. GFP este fluorescentă ca monomer sau ca dimer, raportul dintre forma monomerică și cea dimerică depinzând de concentrația proteinei și de mediu (Hadjantonakis și Nagy, 2001).

Pentru a intensifica fluorescența și a crește stabilitatea la temperaturi ridicate s-a modificat structura nativă a GFP. S-au realizat de asemenea, forme mutante pentru optimizarea exprimării la mamifere (vezi capitolul 2, secțiunea IV). EGFP⁴ este o formă mutantă care oferă o sensibilitate egală sau mai mare de exprimare comparativ cu β -galactozidaza. Injectarea ARNm care codifică o formă termostabilă a GFP a fost folosită pentru a urmări descendențele celulare în embrionul pre-implantațional de șoarece (Zernicka-Goetz și al., 1996). Nivelurile detectabile de GFP pot fi observate la 1-2 ore după injectarea ARNm (Fig.96).

³Green Fluorescent Protein

⁴Enhanced GFP, GFP intensificată, engl.

Un alt avantaj al GFP ca traser *in vivo* este acela că datorită emisiei fluorescente puternice se pot monitoriza ușor celule individuale sau populații celulare. De exemplu, contracția cardiomiocitelor individuale poate fi vizualizată cu GFP în embrionii vii. În acest fel, diferențierea și migrarea celulară poate fi urmărită într-o manieră nedistructivă, în aceleași embrion și pe tot parcursul embriogenezei (Yu și al., 2003).

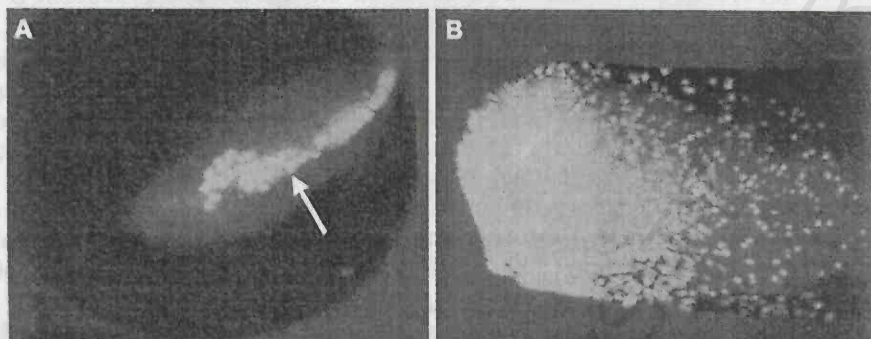


Fig.96. După injectarea a 1 ng de ARNm GFP în una din cele două blastomere a unui embrion timpuriu de *Xenopus*, proteina GFP este detectată în stadiul embrionar 18 în celulele jgheabului neural (săgeata), (A) și în regiunea anterioară a capului, în stadiul 35 (B). (După Zernicka-Goetz și al., 1996).

S-au descris trei metode de marcare a celulelor embrionare *in vivo* cu GFP.

1. Prima metodă de marcare implică injectarea celulelor individuale sau a grupurilor de celule cu ARNc purificat. Metoda permite traducerea citoplasmatică și generarea GFP. Deoarece ARNc este degradat rapid, numai proteina este pasată de la o celulă la alta în cursul diviziunilor celulare. S-a demonstrat că atunci când ARNc care codifică constructul format din gena glutatión S-transferazei și gena *gfp* a fost injectat în blastomere individuale de *D. rerio*, fluorescența GFP a fost identificată în progenitura celulelor injectate (Peters și al., 1995). Din păcate, exprimarea nu durează decât patru zile, și din acest motiv nu este superioară metodelor clasice.
2. A doua metodă de marcare a celulelor embrionare este aceea de a introduce intracelular un construct genetic care codifică GFP. În acest mod se permite trecerea transgenei la celule fiice care pot exprima GFP în cursul migrării și diferențierii. Introducerea transgenei poate fi realizată prin injectarea ADN, electroporare sau transducție virală. Regiunile promotor folosite în acest scop pot fi ubiquie sau specifice de țesut. De exemplu, s-au generat șoareci transgenici după microinjectarea în zigot a unui construct *gfp*, direcționat de o regiune promotor specifică proteinei nestină din neuroni. La acești șoareci s-a putut urmări pe baza fluorescenței GFP, neurogeneza, migrarea și diferențierea neuronilor în cursul embriogenezei și la adult. Aceste experimente au evidențiat că populația de celule progenitoare neurale și neurogeneza, persistă și la adult (Yamaguchi și al., 2000). Regiunile promotor folosite pentru exprimarea ubicuă a GFP includ: promotorul poliubiquitin de la *Drosophila*, promotorul citomegalovirus, promotorul HSP 70 de la *Xenopus*, promotorul actinei citoscheletice de la *X. borealis*, promotorul β -actinei de la om, crap, găină, promotorul ROSA26. Dintre regiunile promotor folosite pentru exprimarea specifică de țesut a GFP amintim:

promotorul creatin kinazei musculare, promotorul pentru exprimarea transgenelor în mușchi, promotorul GFAP⁵ din astrocite, promotorul collagenului tip II murin în condrocite și promotorul L7 în celulele Purkinje.

3. A treia metodă implică introducerea în embrion a unor celule modificate genetic. De exemplu, s-a stabilit o linie de celule stem embrionare transformată cu un construct format din regiunea promotor a genei care codifică β -actina de găină și gena *gfp*. După transplantarea celulelor în striatumul de șobolan s-a monitorizat migrarea și diferențierea celulelor stem embrionare marcate cu GFP. Pe baza acestor experimente autorii au descris o subpopulație de celule pozitive pentru GFP care se diferențiază în neuroni ce exprimă markerul neuronal Thy-1 și în astrocite pozitive pentru GFAP (Arnhold și al.,2000).

β -galactozidaza extrasă din *Escherichia coli* este o enzimă compusă din patru tetrameri, fiecare cu o greutate moleculară de 465-kDa. Ea catalizează reacția a doi moli de substrat cromogenic 5-bromo-4-clor-3-indolil- β -D-galactopiranozid (X-gal), la doi moli de 5-bromo-clorindoxil, convertit ulterior în prezența oxigenului, la un mol de produs de reacție albastru, 5,5'-dibromo-4,4'-dicloroindigo (Spergel și al.,2001). β -galactozidaza este codificată de gena *lacZ* și poate fi detectată prin imunocitochimie sau hibridizare in situ (pentru detalii vezi capitolul 5, secțiunea III).

Protocol experimental de injectare a trasorilor intracelulari la amfibieni

1. Îndepărtarea învelișului gelatinos (vezi capitolul 1, subcapitolul *Xenopus laevis*, secțiunea IV).
2. Plasarea ovulelor, zigoșilor sau embrionilor în 3-5% Ficoll, diluat în soluția de injectare (0,5X soluție Ringer modificată de Marc sau soluție Steinberg). Acest tratament permite segmentarea embrionului într-o manieră stereotipă, hipertonicitatea împiedicând fluxul exterior al citoplasmei prin punctul de injectare.
3. Plasarea embrionilor pe lame de microscop siliconizate și autoclavate, în picături de soluție de injectare. 1-15 embrioni în fiecare picătură.
4. Se realizează micropipeta de injectare, din sticlă borosilicat. Pentru injectarea de ARN micropipetele se tratează cu DEPC și se autoclavează.
5. Se umple micropipeta, fie manual prin introducerea soluției prin capătul opus vârfului, folosind o pipetă Pasteur cu vârf fin sau se poate folosi un injector.
6. Se calibrează pipeta de injectare.
7. Se plasează lamele cu embrioni la un stereomicroscop.
8. Se injectează embrionii prin punționarea membranelor viteline și plasmatică la un unghi de 90° (Fig.97) Se păstrează același unghi atât la injectare cât și la scoaterea seringii. Unghiurile diferite de penetrare și ieșire

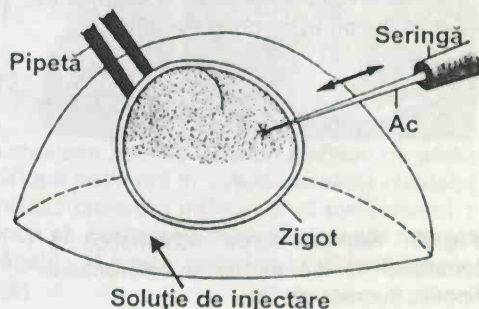


Fig.97. Schema injectării embrionului de *Xenopus*.

⁵Glial Fibrillary Acidic Protein, proteina acidă fibrilară glială, engl.

ale seringii pot cauza alterări. Embrionul poate fi imobilizat cu o pensă. Se injectează 10-50 mg/ml dextrans; 5% HRP, 300-500 pg/celulă de ARNm β -galactozidază sau ARNm *gfp*. Dextranii cuplați cu fluorocromi sunt dizolvați în 0,2 M KCl (pH 6,8), HRP în apă distilată sterilă și ARNm în tampon Tris-HCl cu EDTA și fără RNază. Se încearcă diferite diluții pentru aflarea concentrației optime.

9. Plasarea embrionilor în vase Petri, cu 10-15 ml soluție de injectare.

10. Într-un interval de 2-3 ore soluția de injectare se schimbă progresiv cu 0,1X soluție Ringer modificată de Marc. Soluția de injectare poate determina anomalii ale gastrulării. Prima schimbare de tampon nu se face înainte de a avea loc 3-4 diviziuni de segmentare. În mod normal 10-20% din embrionii injectați mor.

11. În funcție de trasorul folosit, embrionii sunt procesați în continuare în felul următor:

a. Embrioni injectați cu HRP

- Fixare 1-2 ore, în 2,5% glutaraldehidă în tampon fosfat salin, pH 7,4.
- Spălare cu tampon fosfat salin, 4 băi, a câte 30 minute fiecare baie.
- Incubare în soluție 0,05% 3,3' diaminobenzidină (DAB) în tampon fosfat salin, cel puțin o oră.
- Se adaugă la soluție 0,003% H_2O_2 și se incubează încă 5-15 minute. Se verifică reacția la microscop. În momentul în care reacția este optimă se stopează dezvoltarea cu tampon fosfat salin.
- Embrionii se pot observa *in toto*, se pot secționa la criotom sau se includ în parafină pentru a fi secționați la microtom.

b. Embrionii injectați cu dextrans cuplați cu fluorocromi sau ARNm/ADNc *gfp* sunt fixați cel puțin 2 ore în 3,5% paraformaldehidă în tampon fosfat salin și vizionați la microscopul de fluorescență.

c. Embrionii injectați cu ARNm β -galactozidază sunt vizualizați histochimic prin hibridizare *in situ* (vezi capitolul 5, secțiunea III).

B. Trasori membranari lipofilici fluorescenți

Acești trasori sunt intens fluorescenți și pot fi folosiți pentru urmărirea destinului celular pe perioade lungi de timp. Sunt injectați extracelular. Datorită caracterului lipofilic se încorporează în membranele plasmatice ale blastomerele (Fig.98) și nu sunt transferați între celulele vecine.

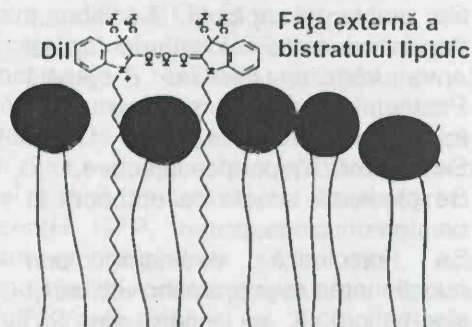


Fig.98. Reprezentarea schematică a localizării în membrană a colorantului lipofilic fluorescent Dil.

După diviziune, membrana care a încorporat colorantul este distribuită celulelor fiice. De obicei, colorantul este dizolvat într-un solvent organic și aplicat prin intermediul unui microelectrod, astfel încât sunt marcate un număr mic de celule (între 2 și 100 de celule, în funcție de specie, stadiul de dezvoltare și condițiile de injectare).

Carbocianidele lipofilice cele mai folosite sunt reprezentate de Dil⁶ cu fluorescență roșie-portocalie, DiO⁷ cu fluorescență verde și DiD cu fluorescență roșie. DiO și Dil pot fi observați la microscopul de fluorescență standard, cu filtre pentru fluoresceină și rodamină, în timp ce DiD necesită microscop He-Ne laser. În tabelul 7 sunt prezentați cei mai folosiți trăsori carbocianine în studiul descendențelor celulare.

Tabel 7. Trăsori membranari lipofilici fluorescenți

Colorant	Excitație (nm)		Filtre de vizualizare	Solubilitatea în etanol
	Absorbție	Emisie		
Dil	553	570	Rodamină	Moderată
DiOC ₁₈	484	501	FITC	Scăzută
5,5'-Ph ₂ -DiOC ₁₈	496	513	FITC	Moderată
DiA/4-Di-16-ASP	491	613	FITC	Bună

(după Quinlan și al.,2001)

Descendenții celulelor marcate pot fi identificați în embrionul de găină până la o săptămână după marcarea (Fig.99). Existența mai multor astfel de coloranți, cu fluorescențe diferite face posibilă nu numai marcarea unuia sau mai multor grupuri de celule în același embrion, dar se poate controla și transferul posibil de colorant între grupurile celulare. De exemplu, se marchează două grupuri adiacente de celule, fiecare cu câte un colorant și embrionii sunt observați după un anumit interval de timp, pentru identificarea celulelor dublu-marcate.

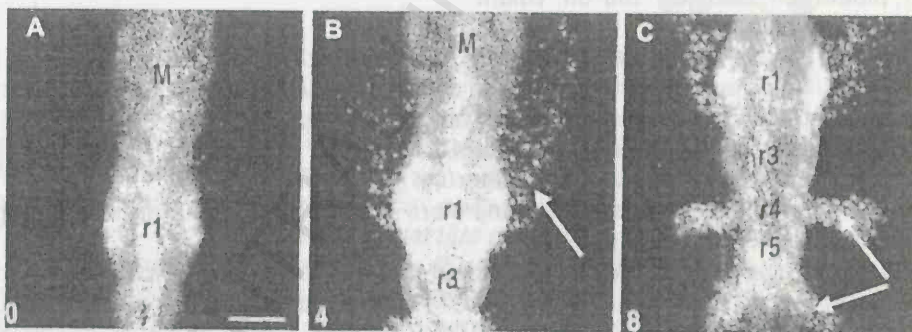


Fig.99. A-Celule ale tubului neural și ale creștelor neurale dintr-un embrion de găină în stadiul de 9 somite, marcate cu Dil. **B-**După patru ore în cultură, celulele creștelor neurale marcate cu Dil migrează de la nivelul creierului mijlociu și al rombomerei 1 (săgeată). **C-**După opt ore de cultură, încep să migreze și celulele creștelor neurale de la nivelul rombomereilor 4 și 6 (săgeți). M-creier mijlociu; r1-r6-rombomere. Bara=100μm. (După Kulesa și Fraser,1999).

Deoarece acești coloranți sunt lipofilici și insolubili în apă, embrionii care conțin celule marcate nu pot fi secționați fără împrăștierea colorantului. Există unele tehnici în care embrionii marcați sunt înghețați sau incluși în gelatină, secționați și montați pentru vizualizare într-un mediu apos. Cea mai bună metodă de a stabili acest tip

⁶1,1'-dictadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate.

⁷3,3'-dioctadecyloxcarbocyanide percholate

de colorant se realizează prin fotoconversia fluorescenței într-un precipitat insolubil de diaminobenzidină, ce permite includerea în parafină (Quinlan și al., 1999 ; Ruiz i Altaba și al., 1993).

Protocol experimental de marcare a epiblastului de șoarece cu trasori lipofilici

Pentru injectare se folosesc embrioni de șoarece de 6 zile jumătate, izolați din uter prin metoda prezentată în capitolul 1, subcapitolul *Mus musculus*, secțiunea IVA.

Injectarea epiblastului se realizează la stereomicroscop.

1. Cu ajutorul pipetei de transfer se plasează pe o lamelă o picătură de 5 μ l de mediu (mediu PB1 cu 10% ser fetal de vițel) pentru imobilizarea embrionului în timpul manipulării. O a doua picătură de 5 μ l de colorant lipofilic este plasată la ~1 cm de prima (Fig.100). Soluțiile stoc de 0,5% DiO sau Dil în etanol absolut se diluează înainte de injectare 1:10 pentru Dil și 1:5 pentru DiO în 0,3 M zaharoză.
2. Se inversează lamela și se plasează peste două bare de sticlă de 3 X 3 X 30 mm (Fig.100).
3. Se umple camera de injectare (vasul Petri) cu ulei de parafină ușor.
4. Se transferă embrionii în camera de injectare și se plasează la microscop. Pentru injectare, embrionii se aspiră individual din camera de injectare cu o pipetă de transfer, într-un volum mic de mediu.
5. Se assemblează micromanipulatoarele. Se atașează pipeta de susținere la brațul drept al micromanipulatorului și pipeta de injectare la cel stâng. Pipeta de susținere este controlată de o seringă micrometru, în timp ce pipeta de injectare este controlată de o seringă Fonbrune. Cu această configurație se poate realiza simultan poziționarea micromanipulatorului și controlul seringii.
6. Se umplu pipetele de susținere și injectare cu ulei de parafină greu, prin capetele opuse vârfulor.
7. Se aduce pipeta de susținere în câmpul microscopului, prin împingerea prin ulei. Se aspiră o cantitate mică de mediu în pipeta de susținere pentru a crea un menisc ulei-mediu.
8. Se aduce în câmpul microscopului pipeta de injectare. Aceasta nu trebuie să conțină mediu de cultură, deoarece contactul cu soluțiile apoase determină precipitarea coloranților lipofilici.
9. Pentru evitarea contaminării cu trasor se retrage pipeta de susținere și de injectare din picătura de mediu de cultură. Se aduce picătura de colorant în câmpul microscopului prin deplasarea platinei microscopului.
10. Se introduce vârful pipetei de injectare în picătura de colorant și se aspiră un volum mic, folosind seringă Fonbrune. Se menține întotdeauna meniscul trasor-ulei în câmp, pentru că el oferă singurul mijloc de a monitoriza injectarea colorantului în timpul marcării. Se scoate pipeta de injectare din colorant când meniscul colorant-ulei nu se mai deplasează.
11. Se aduce picătura de mediu ce conține embrionii în câmpul microscopului.
12. Se orientează corect embrionul cu ajutorul pipetelor și se aduce în câmpul microscopului. Ulterior se aduc în câmpul microscopului pipetele de injectare și

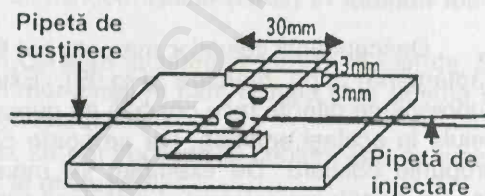
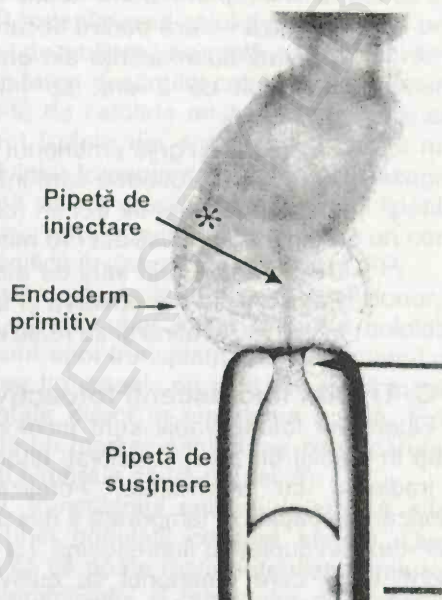


Fig.100. Reprezentarea schematică a camerei de injectare a embrionilor de șoarece de 6 zile jumătate.

susținere. Se ating ușor pipetele de injectare și susținere pentru a vedea dacă sunt în același plan.

13. Se aduce pipeta de susținere în contact cu endodermul embrionului, chiar lângă epiblastul ce va fi marcat. Cu seringă micrometru se aplică o forță de sucțiune pentru a trage embrionul către pipeta de susținere. Se aspiră o zonă mică din endoderm în pipeta de susținere (Fig.101).

Fig.101. Marcarea epiblastului prin injectarea Dil în regiunea anterioară a embrionului.*-linia primitivă. Săgeata indică vârful pipetei în epiblast. Bara=20μm. (După Quinlan și al.,1999).



14. Se împinge pipeta de injectare prin țesutul extraembrionar în cavitatea amniotică. *Marcarea țesutului embrionar se realizează mai bine prin țesuturile extraembrionare, deoarece reduce șansa de a marca accidental alte foițe embrionare. Chiar dacă în timpul injectării colorantul se scurge din pipetă sau este prezent pe suprafața acesteia, vor fi marcate necorespunzător doar țesuturile extraembrionare.* Se împinge vârful pipetei în epiblast.
15. Se aplică presiune prin seringă Fonbrune pentru a elimina un volum mic de colorant în epiblast. *Pentru a evita injectarea de ulei în embrion este foarte importantă monitorizarea deplasării frontului de soluție colorantă.*
16. După injectare se eliberează embrionul din pipeta de susținere prin aplicarea unei presiuni prin seringă micrometru. Se plasează embrionul 24 de ore în mediul de cultură (DMEM : ser de șobolan în raport de 1:3).
17. Detectarea descendențelor marcate se poate face direct, prin observarea embrionilor la microscopul de fluorescență sau se poate realiza fotoconversia trasorului fluorescent pentru includerea în parafină și secționarea la microtom.

Fotoconversia coloranților lipofilici

Coloranții lipofilici, similar tuturor fluorocromilor, pot fi folosiți pentru conversia DAB într-un precipitat insolubil, electrono-dens, proprietate care permite examinarea țesuturilor marcate în microscopia optică și electronică. Acest procedeu se bazează pe proprietatea fluorocromilor excitați cu lumină ultravioletă de a oxida DAB.

- Incubarea embrionilor 1-3 ore (în funcție de grosimea embrionului), la temperatura camerei, într-un volum mare (10 ml) de soluție DAB (500 $\mu\text{g/ml}$ în 0,1 M Tris pH 7,4), la întuneric. Se plasează câte un embrion în godeul unei lame, în care s-a pus soluție DAB. Se aplică o lamelă și se îndepărtează cu hârtie de filtru excesul de lichid.
- Se așează lama la un microscop cu epifluorescență. Folosind obiectivul de 10X sau 20X se iluminează regiuniile ce conțin celule marcate, câte 10 min, până când toată fluorescența dispare din câmpul iluminat. Durează ~1 oră pentru fiecare câmp. Se continuă și cu alte regiuni până ce toată fluorescența din embrion dispare. Dacă acest proces durează mai mult de 2 ore, se înlocuiește soluția DAB din godeu cu una proaspătă.
- Se scoate cu grijă embrionul din godeu și se transferă într-un vas cu apă de robinet (procedeu care intensifică precipitatul DAB și îl înegrește). Se spală embrionul de trei ori (câte 30 min fiecare baie) în apă de robinet și o dată în apă distilată (10 minute).
- Deshidratare prin serii de alcool 70%, 95%, 100% și clarificare în xilen. Embrionii se pot observa și fotografia *in toto* la microscopul optic sau se includ în parafină și se realizează secțiuni.

C. Trasori fluorescenți fotoactivabili

Fluoroforii fotoactivabili sunt incolori și nu emit lumină fluorescentă. Ei sunt injectați în stadiul de zigot și activați ulterior, în diferite momente ale embriogenezei prin iradierea cu ultraviolete. Fotoliza controlată a acestor trasori permite monitorizarea spațială și temporală a descendențelor celulare. Un astfel de trasor este DMNB⁸-dextran cuplat cu fluoresceină. La *Danio rerio* se injectează 5 mg/ml în stadiul de zigot, după care embrionul se cultivă până în stadiul dorit. Fotoactivarea se realizează cu un fascicul laser. Embrionii sunt fixați peste noapte, la 4°C cu 4% paraformaldehidă în tampon fosfat salin și observați în microscopia de fluorescență (Fig.102A-B). Alternativ, embrionii sunt procesați pentru imunocitochimie, trasorul fiind detectat cu anticorpi anti fluoresceină.

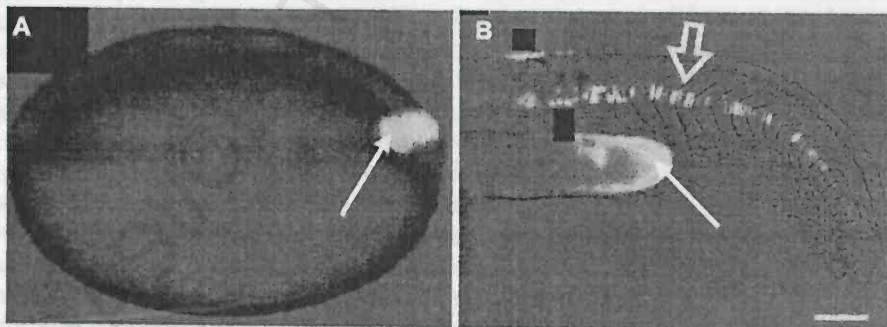


Fig.102. Urmărirea descendenței mezodermale cu fluoresceină fotoactivabilă injectată în zigotul de *D. rerio*. **A**-Fotoactivarea în stadiul de 50% epibolie (săgeata). **B**-Fotoactivare în stadiul de 26 somite (săgeți). Bara=100 μm . (După Kozłowski și al., 1997).

II. TRANSPLANTAREA CELULELOR EMBRIONARE

Există cel puțin patru căi prin care se poate testa momentul determinării unei blastomere: (1) celula poate fi transplantată într-o nouă regiune embrionară pentru a testa dacă descendenții ei sunt produși când celula se dezvoltă într-un mediu embrionar diferit; (2) celula poate fi lăsată *in situ*, dar manipulată astfel încât să se împiedice comunicarea cu celulele vecine; (3) celula poate fi cultivată ca un explant pentru a testa ce tipuri celulare poate produce în absența contactului direct cu celulele vecine sau factorii secretați de acestea; (4) îndepărtarea celulei din embrion pentru a testa dacă prezența ei este necesară pentru dezvoltarea normală a celulelor rămase.

Transplantarea celulară urmărește testarea destinului celulelor embrionare într-un mediu asemănător. Pentru a fi deosebite de celulele embrionului gazdă, celulele sau teritoriile embrionare transplantate sunt izolate din embrionul donor și marcate prin mai multe procedee: (1) incubarea celulelor transplantate cu markeri exogeni, de tipul aglutininei din germenii de grâu, cuplată cu aur coloidal sau coloranți lipofilici; (2) markeri genetici; în acest caz embrionul donor este transgenic și exprimă un construct raportor ce conține gena *lacZ*, gena care codifică fosfataza alcalină sau GFP.

Pentru ambele cazuri, țesutul de interes este izolat din embrionul donor. Dacă este marcat exogen, explantul de țesut este incubat inițial în aurul coloidal sau coloranții lipofilici. Aceste celule marcate sunt apoi transplantate în embrionul gazdă. În cazul transplantării celulelor dintr-un donor transgenic nu este necesară incubarea. După izolarea celulelor ele sunt transplantate direct în embrionul gazdă. Există și situații în care celulele transplantate posedă un marker natural, pe baza căruia pot fi identificate, cum este cazul la prepeliță (vezi himerele găină-prepeliță).

Spre deosebire de marcarea *in situ*, transplantul celular determină alterarea contactelor celulare, datorită introducerii unei populații celulare străine. Cu toate acestea, avantajul transplantării este acela că se poate testa potențialul embrionar al celulelor la situsuri ectopice. Un avantaj semnificativ al metodelor de transplantare este capacitatea de a exploata potențialul markerilor genetici pentru a urmări destinul celular. Când se folosesc celulele donoare ale embrionilor transgenici nu există diluare a markerului în cursul culturii (Quinlan și al., 2001).

A. Transplantarea unei blastomere marcate la *Xenopus laevis*

Scopul îndepărtării unei celule sau a unui grup de celule este acela de a determina rolul respectivei blastomere în cursul dezvoltării.

Protocol experimental

1. Injectarea traserului de tipul dextran cuplat cu rodamină (10-20 nl dintr-o soluție 25 mg/ml) într-un embrion donor, înainte de prima diviziune de segmentare, conform protocolului din secțiunea IA.
2. Plasarea embrionilor în vase Petri de plastic, acoperite cu 2% agaroză, ce conțin 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice. *Agaroza împiedică lipirea embrionilor de vas.*
3. Îndepărtarea manuală a anvelopei viteline cu o pereche de pense (Dumont nr. 5). Se prinde anelopa vitelină la nivelul polului animal, cu două pense și se trage în direcții opuse (Fig. 103).
4. Izolarea regiunii corespunzătoare a embrionului din care vor fi luate celule (regiunea ecuatorială a embrionilor în gastrula timpurie) prin tăierea cu ac de tungsten sau cu fir de păr. Se îndepărtează celulele sparte prin agitare sau

pipetare ușoară, cu o pipetă Pasteur. Se împiedică atingerea suprafeței mediului de către embrioni sau părțile disecate, deoarece datorită tensiunii de suprafață a lichidului se vor dezintegra rapid. Se transferă partea izolată într-un alt vas Petri cu 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, proaspătă.

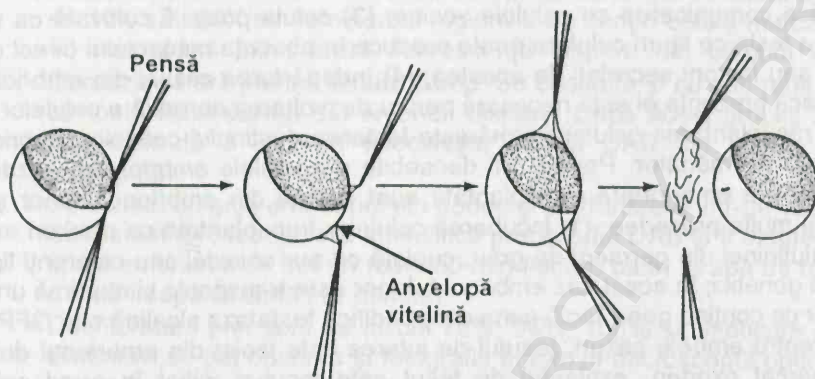


Fig.103. Îndepărtarea anvelopei viteline la amfibieni.

5. După disecarea câtorva embrioni, se transferă părțile izolate la o nouă plăcuță cu 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, fără calciu și magneziu. Plasarea vasului pe o platformă rotativă. Celulele embrionilor timpurii se vor dezintegra în absența calciului și magneziului. Embrionii mai avansați (gastrulă) pot necesita prezența unei proteaze de tipul pronazei (0,5%, 1-2 minute). După 10-60 minute, majoritatea blastomerele vor deveni laxe și plăcuța va conține în centru, o grămadă de celule individuale. Stratul celular exterior este mai rezistent la disociere și poate rămâne mai mult sau mai puțin intact.
6. Plasarea embrionilor gazdă în plăci Petri, tapetate cu agaroză, cu 1X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice. Se transferă un grup mic de celule individuale în plăcuța cu embrionii gazdă. Celulele individuale se țin la distanță, deoarece acum mediu conține calciu și magneziu și acestea au tendința de a reagrega rapid.
7. Se îndepărtează anvelopa vitelină din blastula târzie a embrionilor gazdă. Orificiul din polul animal trebuie să fie cât de mic posibil, astfel încât să nu permită îndepărtarea celulelor din emisfera animală. Orificiul va evidenția blastocelul. *Dacă se pierde prea multe celule sau incizia este prea mare, embrionul nu se vindecă.*
8. Se împinge o singură blastomeră marcată prin lichid și se aduce în apropierea orificiului din polul animal al embrionului gazdă. Se împinge celula în blastocel.
9. Se unesc capetele orificiului. Se lasă embrionul în repaus 20 minute. Când orificiul apare vindecat, se transferă embrionul cu grijă într-un vas tapetat cu agaroză, ce conține 0,1X soluție Ringer modificată de Marc. *Concentrația mai mare de săruri din plăcuța de disecție ajută la vindecarea embrionului, dar este necesară înlocuirea cu o concentrație mai scăzută, înainte de gastrulare, deoarece embrionii vor fi parțial exogastrulați.*
10. Fixarea embrionilor o oră, în 4% formaldehidă sau paraformaldehidă. Includere în parafină și secționare. Identificarea țesuturilor marcate.

B. Transplantarea blastomereleor de amfibian la situsuri ectopice în embrioni gazdă

Este o tehnică prin care se poate afla dacă localizarea celulei în embrion determină destinul său. Această metodă implică marcarea unei celule și transplantarea ei într-o altă regiune dintr-un embrion nemarcat. Această tehnică a demonstrat la *Xenopus*, că unele blastomere de pe linia mediană dorsală elaborează semnale, care determină formarea axelor embrionare. Transplantarea a mai fost folosită pentru a demonstra dacă toate blastomerele sunt competente să dea naștere retinei. Pentru acest tip de experiment este necesară cunoașterea destinului normal al celulei care este transplantată și destinul normal al celulei din embrionul în care va fi transplantată. Pentru a realiza acest test este nevoie de embrioni cu diviziuni de segmentare regulate, o metodă de marcarea a celulei transplantate și o metodă de identificare a fenotipului celulelor rezultate din blastomera transplantată.

Pentru a realiza transplantarea unei singure celule trebuie să existe o rezervă de embrioni donori și una de embrioni gazdă, în același stadiu de dezvoltare. Este mai ușor de transplantat blastomere până în stadiul de 16 celule. Se folosesc: 1 nl de dextran marcat fluorescent (soluție 1%), 500 pg ARNm *gfp* sau β -galactozidază. După marcarea cu dextrani fluorescenți sau ARNm *GFP* embrionii sunt crescuți la întuneric.

Protocol experimental

1. Marcarea celulelor donoare după unul din protocoalele descrise în secțiunea I.
2. Transplantarea blastomereleor marcate în embrionii gazdă. Gazdele se transferă în vase Petri acoperite cu agar în care există depresiuni (Fig.104). Aceste vase conțin 50% soluție Steinberg (sau 0,1X soluție Ringer modificată de Marc), pentru a facilita disecarea celulelor din embrion. În fiecare depresiune se plasează un embrion gazdă și se îndepărtează anvelopa vitelină. Se așează un număr de embrioni donori în centrul vasului de cultură.
3. Se îndepărtează o blastomere din embrionul gazdă. Dacă embrionul este alterat în cursul acestui procedeu se îndepărtează și se trece la următorul.
4. Se plasează imediat un embrion donor lângă gazda operată, se îndepărtează anvelopa vitelină și se izolează celula dorită. Înainte de a transporta blastomera donor în embrionul gazdă se verifică dacă rana în gazdă este destul de mare. Vasul Petri nu se mută până ce transplantul nu s-a integrat, (~o oră). Embrionii trebuie să stea câteva ore neperturbați. Odată ce embrionii care au suferit transplantul s-au vindecat ei trebuie transferați în vase Petri cu depresiuni și mediu de cultură proaspăt. Embrionii sunt crescuți până în stadiul dorit, fixați și procesați în funcție de trasorul folosit.

Această metodă determină o mortalitate mare, 20-30% rată de supraviețuire. Când se folosesc trasori fluorescenți se verifică la microscopul de fluorescență, dacă embrionii au semnal cu obiectivul 10X. Dacă trasorul nu este vizibil și nu se pot distinge descendențele transplantate în gază, nu are rost procesarea pentru histologie sau imunohistochimie (Moody, 1999).

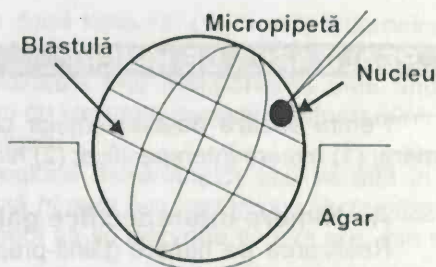


Fig.104. Poziția embrionului de amfibian în cursul injectării.

C. Cultivarea blastomereleor de *Xenopus laevis*

Este o metodă prin care o celulă este îndepărtată de toate interacțiile cu celulele vecine. Deoarece blastomerele de *Xenopus* conțin cantități mari de vitelus, ele pot supraviețui în cultură fără suplimente nutriționale. În plus, se pot testa necesitățile celulare pentru factorii de creștere exogeni, prin cultivarea lor cu sau fără factori de creștere. Pentru a elimina rolul producerii și legării la matricea extracelulară, blastomerele pot fi cultivate pe un pat de agaroză ca mai sus. Alternativ, pentru a testa influența diferitelor substraturi extracelulare asupra potențialului de diferențiere, celulele pot fi cultivate în plăcuțe acoperite cu aceste molecule.

Cultivarea blastomereleor necesită aceleași instrumente și soluții ca cele descrise anterior. Plăcuțe de 60 mm acoperite cu agaroză, fără depresiuni. Se cultivă o blastomeră sau un grup mic (până la patru) într-o plăcuță ce conține mediu normal pentru amfibieni. *Această soluție este slab tamponată și deci nu poate fi stocată; se prepară proaspătă în dimineața experimentului și se schimbă soluția cu mediu proaspăt preparat după fiecare zi de cultură.* Fiecare placă se umple cu 500-800 μ l de mediu normal pentru amfibieni, steril. Se poate folosi pentru cultură și 50% mediu L-15.

Pentru a pregăti blastomerele pentru cultură, se folosesc embrioni de la care s-a îndepărtat învelișul gelatinos și anvelopa vitelină. Se disecă din embrion blastomera dorită evitând atingerea celulei cu pensa. Operația se realizează în 50-70% soluție Steinberg sau 0,3-0,5X soluție Ringer modificată de Marc. Celula se plasează rapid în cultură cu o pipetă Pasteur sterilă. *Se evită folosirea pipetelor de plastic, deoarece blastomerele aderă foarte bine de plastic.*

Blastomerele cad la fundul plăcuțelor acoperite cu agar și formează agregate. Este dificilă cultivarea blastomereleor din embrioni mai avansați de stadiul de 16 celule, însă blastomerele tinere sau grupurile mici (2-6 celule) ale aceleiași blastomere cresc foarte repede.

Explantate pot fi cultivate 36-48 ore. Ele pot fi colectate și fixate pentru imunocitochimie *in toto*, histologie sau hibridizare *in situ* sau pot fi omogenizate pentru analiza exprimării genelor. În unele cazuri, morfologia lor externă poate indica ce țesut exprimă. Astfel, blastomerele care rămân rotunde exprimă derivate mezodermale ventrale, cele alungite moderat exprimă derivate mezodermale dorsale. Cu toate acestea, morfologia nu este un criteriu al diferențierii celulare. Se recomandă testarea explantelor cu markeri specifici pentru un țesut diferențiat. De exemplu, markerii pentru mezodermul dorsal pot fi exprimați în explante care nu au celule alungite.

III. REALIZAREA DE HIMERE

Pentru analiza descendențelor celulelor embrionare se folosesc două tipuri de himere: (1) himere interspecifice; (2) himere intraspecifice.

A. Himere interspecifice găină-prepeliță

Realizarea de himere găină-prepeliță se bazează pe observația că în celulele embrionare și adulte de prepeliță (*Coturnix coturnix japonica*) heterocromatina este condensată sub forma unei mase, asociată cu nucleolul (Fig.105A). Uneori există două sau trei astfel de formațiuni în centrul nucleului. Acestea se colorează puternic prin reacția Feulgen-Rossenbeck (Teillet și al.,1999). Celulele de găină (*Gallus domestica*) prezintă ca majoritatea celulelor animale cromocentrii mici, dispersați în

nucleoplasmă (Fig.105B). Datorită acestui marker natural, celulele de prepeliță se disting ușor atunci când sunt combinate cu cele de găină (Fig.105C).

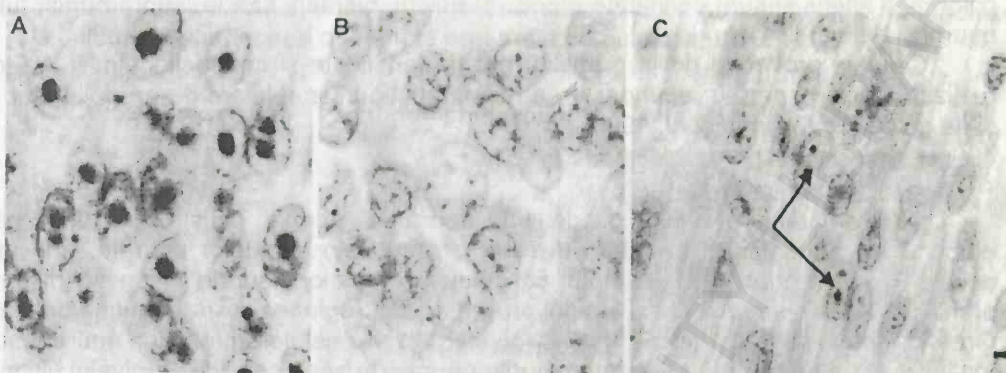


Fig.105. A-Neuroblaste de prepeliță. B-Neuroblaste de găină. C-Himeră găină-prepeliță, în care se remarcă celule conjunctive de găină, localizate printre mioblaste de prepeliță (săgeți). (După Couly și al.,1993).

Prepelița și găina sunt organisme înrudite, deși diferă prin greutatea la ecloziune (10 g prepeliță și 30 g găina) și prin durata perioadei de incubare (17 zile la prepeliță și 21 zile la găină). În timpul primei săptămâni de incubare, când majoritatea evenimentelor embrionare au avut loc, dimensiunea embrionului și cronologia dezvoltării diferă foarte puțin.

Analiza himerelor găină-prepeliță după ecloziune este limitată. Deși în cursul embriogenezei nu are loc o reacție imună împotriva grefei, în momentul în care se formează sistemul imun, transplantul ținește propria rejecție, în diferite momente după ecloziune. În cazul grefelor neurale există o întârziere lungă între debutul maturității imunitare și rejecție, deoarece bariera hemato-encefalică izolează limfocitele circulante de sistemul nervos central. În plus, celulele neurale au imunogenitate scăzută și nu exprimă (sau foarte puțin) molecule ale complexului major de histocompatibilitate. Această întârziere a răspunsului imun, de 1-2 luni permite realizarea studiilor comportamentale.

Prin metoda himerelor s-a studiat migrarea celulelor creșterii neurale către destinația finală și cartarea primordiului neural.

Himerele interspecifice pot fi realizate în două variante: (1) himere izocronice și izotopice; (2) himere heterocronice și heterotopice.

Himerele izocronice și izotopice se realizează prin îndepărtarea unui anumit teritoriu dintr-un embrion gazdă și înlocuirea lui cu regiunea corespunzătoare dintr-un embrion donor, aflat în același stadiu de dezvoltare.

Dacă țesutul donor este luat din altă regiune (heterotopic) sau se află în alt stadiu de dezvoltare (heterocronic) se realizează himere heterocronice și heterotopice. În ambele cazuri embrionul gazdă este lăsat apoi să se dezvolte câteva ore, zile sau să eclozeze.

Identificarea teritoriilor rezultate din celulele transplantate de prepeliță se realizează prin colorarea nucleului prin reacția Feulgen-Rossenbeck, Acridine orange sau Hoechst 33258.

În celulele embrionare timpurii (blastomere tinere) masa de cromatină centronucleară este foarte mare, cu margini neregulate și structură reticulară, însă nu

se colorează foarte intens. Un aspect asemănător este caracteristic pentru precursorii hematopoietici timpurii. În celulele embrionare mai avansate și celulele diferențiate, nucleul conține una sau două grupuri de cromatină centronucleare, compacte, care se colorează intens și sunt delimitate precis, în rinichi, plămân, tiroidă, suprarenală, tubul neural și derivatele neurale.

Celulele provenite de la prepeliță pot fi identificate și imunocitochimic. Au fost realizați anticorpi pentru recunoașterea majorității tipurilor celulare de prepeliță dar nu și de găină (Le Douarin și al., 1996).

Protocol experimental

Transplantarea fragmentelor de tub neural a permis construirea unei hărți embrionare și identificarea căilor de migrare a celulelor creștelor neurale. Principiul acestor grefe se bazează pe faptul că celulele creștelor neurale încep să migreze prima dată în regiunea cefalică și apoi progresiv, din regiunea rostrală în cea caudală. Grefele interspecifice se realizează la nivelul la care celulele creștelor neurale sunt încă în apexul tubului neural, în jgheaburile neurale în zona cefalică, la nivelul ultimilor somite în regiunile cervicală și toracică și la nivelul plăcii segmentate în regiunea lombo-sacrală. Țesutul grefat cuprinde 5-6 somite (Teillet și al., 1999).

1. Excizarea tubului neural gazdă: fragmentul de tub neural este excizat din embrionul gazdă prin microchirurgie *in ovo*. Oul se accesează prin unul din protocoalele experimentale prezentate în capitolul 1, subcapitolul *Gallus domestica*, secțiunea IIA. Se secționează longitudinal ectodermul, între tubul neural și mezodermul paraxial adiacent, la nivelul dorit, bilateral. Tubul neural este apoi separat ușor de mezodermul vecin și tăiat transversal, rostral și caudal fără lezarea notocordului și a endodermului. Fragmentul de tub neural este apoi separat progresiv de notocord și în final aspirat cu o micropipetă.
2. Prelevarea grefei: se recoltează regiunea transversală a embrionului donor, ce cuprinde fragmentul echivalent de tub neural, plus țesuturile înconjurătoare (ectoderm, endoderm și mezoderm) și se supune digestiei enzimatice *in vitro*, cu pancreatină în tampon fosfat salin sau soluție Tyrode, 5-10 minute, pe gheață, sau la temperatura camerei în funcție de stadiul embrionar. Pancreatina se diluează 1:3 sau 1:6 cu tampon fosfat salin sau soluție Tyrode. Ambele soluții conțin antibiotice (10-20 UI/ml penicilină și streptomycină). În acest fel, disocierea țesutului poate fi controlată ușor. Concentrația și temperatura sunt adaptate stadiului de dezvoltare și țesutului. Pentru țesuturile mai tinere se folosesc titruri și temperaturi mai scăzute. De exemplu, țesuturile din embrionii în stadiul de 10 somite vor fi tratați cu 20% pancreatină în soluție Tyrode, pe gheață, în timp ce țesuturile din embrionii în stadiul de 20 de somite vor fi tratați cu 30% pancreatină la temperatura camerei. Tratamentul enzimatic îndepărtează țesuturile care înconjoară tubul neural. În momentul în care fragmentele de tub neural sunt izolate se blochează activitatea enzimei proteolitice prin spălare cu ser bovin în tampon fosfat salin sau soluție Tyrode.
3. Operația de grefare: tubul neural donor este transferat în embrionul gazdă cu o micropipetă și plasat în locul celui excizat (Fig. 106A).
4. După grefă se sigilează oul și se reincubează în poziție orizontală.
5. În funcție de modelul experimental și scopul urmărit, analiza himerelor se face prin fixarea embrionilor la câteva ore de la operație, la câteva zile sau după ecloziune. Fixarea se realizează în fixatorul Carnoy, pentru colorarea Feulgen-Rossenbeck, imunocitochimie și hibridizare *in situ* pe secțiuni și în 4% paraformaldehidă, pentru

hibridizare *in situ* și imunocitochimie *in toto*. Himerele pot fi observate și macroscopic, după aspectul penajului. Celulele creștelor neurale de prepeliță migrează în embrionul de găină și se diferențiază în melanocite, care colonizează mugurii penelor. Astfel, penele ce conțin melanocite de prepeliță vor fi mai închise la culoare și vor acoperi o anumită regiune a corpului (Fig.106B).

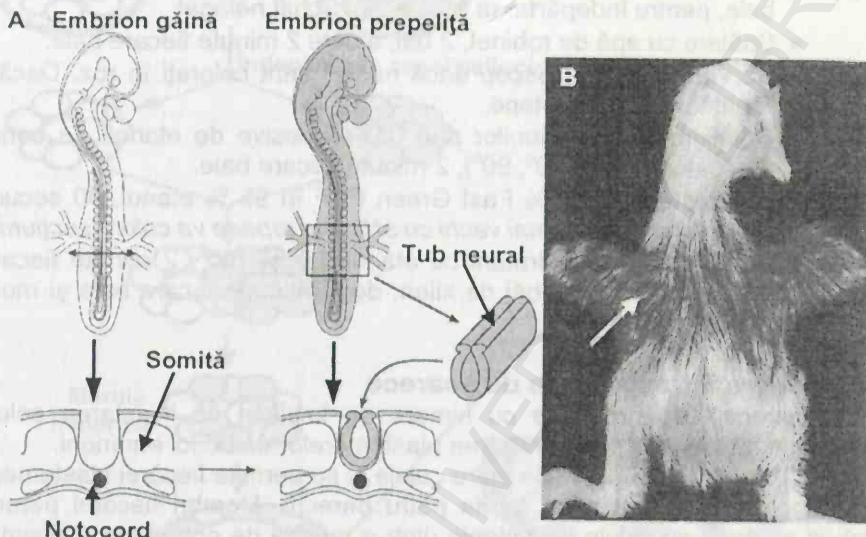


Fig.106. A-Schema transplantării tubului neural de la prepeliță la găină. B-Fenotipul puilor himerici. Celulele creștelor neurale de prepeliță migrează în embrionul de găină, unele din ele diferențiindu-se în melanocite, care colonizează mugurii penelor din zona transversală a corpului (săgeata).

Colorația Feulgen-Rossenbeck permite detectarea grupurilor de celule de prepeliță, însă la nivelul unei singure celule, acuratețea reacției nu este așa de bună ca în cazul imunocitochimiei (Darnell și Schoenwolf, 1997). Reacția Feulgen-Rossenbeck este o tehnică histochimică specifică pentru ADN. Specificitatea reacției este dată de prezența deoxiribozei în structura ADN și implică eliberarea prin hidroliză acidă blândă a bazelor purinice (adenină și guanină) și obținerea unui compus ce conține numai bazele pirimidinice, numit acid apurinic. Prin îndepărtarea purinelor, ciclul furanozic al ribozei se desface (are loc trecerea în forma liniară), astfel încât la carbonul 1 al ribozei (C₁) apare o grupare aldehidică. Grupările aldehidice interacționează cu leucoderivatul fucsinei bazeice (reactivul Schiff) și formează un complex colorat în roșu-violaceu, specific pentru ADN.

- Fixarea embrionilor 1-3 ore, în fixator Carnoy și includere în parafină. *Embrionii fixați în Carnoy pot fi transferați direct în etanol absolut sau în amestec etanol absolut : cloroform (1:1).*
- Secțiunile realizate la microtom sunt deparafinate în trei băi succesive de xilen (2 minute fiecare baie), hidratate prin trei băi succesive de alcool etilic de concentrații descrescătoare (100°, 95°, 70°), 2 minute fiecare baie și două băi de apă distilată, 2 minute fiecare baie.

- Hidroliză acidă cu 1N HCl, proaspăt preparat: o baie de 2 minute, la temperatura camerei, a doua baie de 6 minute la 60° și a treia baie de 2 minute tot la temperatura camerei.
- Spălare cu apă distilată, 2 minute.
- Colorare cu reactivul Schiff, o oră, la 24°C.
- Spălarea secțiunilor cu apă sulfuroasă, 3 băi, a câte 2 minute fiecare baie, pentru îndepărtarea reactivului Schiff nelegat.
- Spălare cu apă de robinet, 2 băi, a câte 2 minute fiecare baie.
- Se verifică la microscop dacă nucleii sunt colorați în roz. Dacă nu, se repetă ultimile trei etape.
- Deshidratarea secțiunilor prin băi succesive de etanol, de concentrații crescătoare (50°, 70°, 90°), 2 minute fiecare baie.
- Contrastare cu 0,1% Fast Green FCF în 95 % etanol, 30 secunde. *Cu cât colorantul este mai vechi cu atât mai repede va colora secțiunile.*
- Continuarea deshidratării cu etanol 95° și 100°, 2 minute fiecare baie. Clarificare prin trei băi de xilen, două minute fiecare baie și montare în balsam de Canada.

B. Himere intraspecifice de șoarece

La șoarece, experimentele cu himere au implicat fie injectarea celulelor în blastocelul unui blastocist sau agregarea blastomerele de la doi embrioni.

Se disociază doi embrioni de patru celule și se permite fiecărei blastomere să se mai dividă o dată, pentru a se forma patru perechi. Membri fiecărei perechi sunt separați și agregați cu celule individuale dintr-o morulă de opt celule și plasate într-o femelă purtătoare pseudogestantă. Celulele donoare poartă forma alelică a *Gpi-1^a*, în timp ce morula gazdă poartă *Gpi-1^b*. În plus, linia donoare este albinotică, astfel încât himerele care se dezvoltă pot fi distinse după culoarea blănii. Himerele care poartă formele alelice ale enzimei GPI-1 sunt detectate electroforetic.

Morula timpurie este materialul favorit pentru realizarea himerelor de agregare, deoarece blastomerele sunt relativ adezive și motile înaintea formării joncțiunilor între celulele externe (viitorul trofotoderm). Procedul standard este acela de a plasa morule timpurii, cu diferite genotipuri, în același stadiu de dezvoltare, în perechi. Blastomerele sunt fără de zona pellucida. Agregarea reușită conduce la formarea unui blastocist alcătuit dintr-un număr dublu de celule. După transferul în uter al acestor blastociști giganti are loc un proces reglator necunoscut, de reducere a numărului de celule, astfel încât numărul lor la începutul gastrulării este egal cu cel al unui embrion normal. Pentru a evita acest proces se agregă în perechi doar jumătate din morule (Gardner și Davies, 1999). Dacă o morulă provine de la o femelă albinotică iar cealaltă de la una neagră, nou-născuții sau adulții himerici pot fi identificați după blana mozaicată (Fig.107).

Protocol experimental

Se îndepărtează zona pellucida cu soluție Tyrode acidă. Cu o pipetă, se transferă embrionii dintr-o picătură de mediu de cultură M2, într-un ml soluție Tyrode acidă, la temperatura camerei, în vase de 35 mm. Se agită ușor fără dispersarea embrionilor. Se observă continuu la stereomicroscop. Odată ce zona pellucida este dizolvată (~1-2 minute) embrionii se vor lipi de vas. Imediat se umple vasul cu mediul M16, pentru neutralizarea acidității.

1. Se transferă embrionii fără zona pellucida în picături de mediu M16 fără calciu, cu 6 mg/ml albumină serică bovină, sub ulei de parafină ușor.

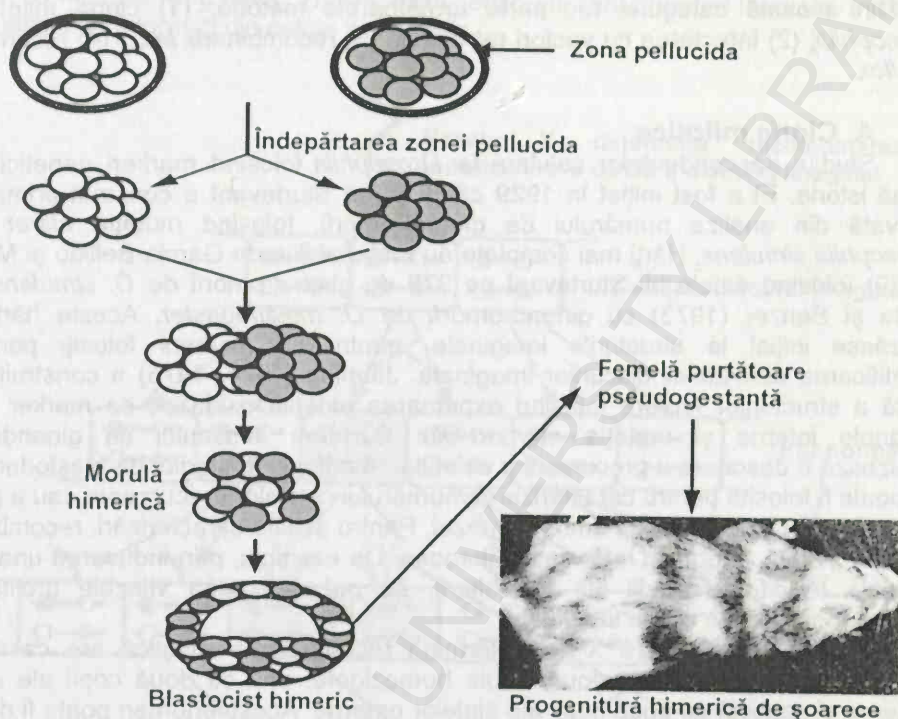


Fig.107. Schema obținerii himerelor de șoarece prin fuziunea unei morule de șoarece albinotic cu una de șoarece pigmentat.

2. Se plasează în incubator cu 5% CO₂ la 37°C, 10-15 minute. Se dezagregă embrionii în blastomere prin pipetare cu pipete de sticlă.
3. Se îndepărtează blastomerele din mediul M16 fără calciu cât de repede posibil. Blastomerele izolate sunt foarte lipicioase, astfel încât se plasează individual sau în grupuri mici într-o picătură de mediu M16, în vase Petri de care să nu adere.
4. Se transferă blastomerele în perechi sau triplete, în vase de cultură cu picături de mediu M16. Cu ajutorul unei pipete de sticlă sau ac se împing blastomerele împreună. Sau se fac depresiuni conice pe fundul vasului. După o oră de incubare la 37°C, blastomerele aderă pentru a forma un singur embrion. Se continuă incubarea până ce embrionii sunt compactizați sau ajung în stadiul de blastocist (1-2 zile de cultură).
5. Se transferă himerale în uterul femelelor aflate la 2 zile jumătate de pseudogestație.

IV. METODE GENETICE DE URMĂRIRE A DESCENDENȚELOR CELULARE

Din această categorie fac parte următoarele metode: (1) clone mitotice, la *Drosophila*; (2) infectarea cu vectori retrovirali; (3) recombinare *lacZ*; (4) recombinare *Cre/lox*.

A. Clone mitotice

Studiul descendențelor celulare la *Drosophila* folosind markeri genetici are o lungă istorie. El a fost inițiat în 1929 când Alfred Sturtevant a construit prima hartă derivată din analiza numărului de ginandromorfi, folosind mutația *claret* de la *Drosophila simulans*. Hărți mai complete au fost stabilite de Garcia-Bellido și Merriam (1969) folosind datele lui Sturtevant pe 379 de ginandromorfi de *D. simulans* și de Hotta și Benzer (1973) cu ginandromorfi de *D. melanogaster*. Aceste hărți erau restrânse inițial la structurile imaginale, pentru că markerii folosiți permiteau identificarea derivatelor discurilor imaginale. Janning (1974, 1976) a construit prima hartă a structurilor larvare folosind exprimarea aldehid oxidazei, ca marker pentru organele interne și mutația *maroon-like*. Cartarea destinului cu ginandromorfi furnizează o descriere a precursorilor celulelor imaginale în stadiul de blastoderm, dar nu poate fi folosită pentru caracterizarea numărului celulelor precursor sau a poziției ocupate mai târziu în cursul embriogenezei. Pentru aceste caracterizări, recombinarea mitotică indusă a furnizat informații valoroase. De exemplu, prin inducerea unei clone marcate în diferite stadii ale dezvoltării, se pot determina vitezele proliferărilor diferitelor grupuri de celule imaginale.

Tratamentul cu raze X ce determină recombinarea mitotică are ca rezultat formarea după diviziune a două celule homozigote, una cu două copii ale alelelor materne și cealaltă cu două copii ale alelelor paterne. Acest fenomen poate fi detectat dacă embrionul ales este heterozigot pentru o mutație într-o genă marker, așezată lângă gena de interes, astfel încât cele două gene suferă împreună procesul de crossing-over.

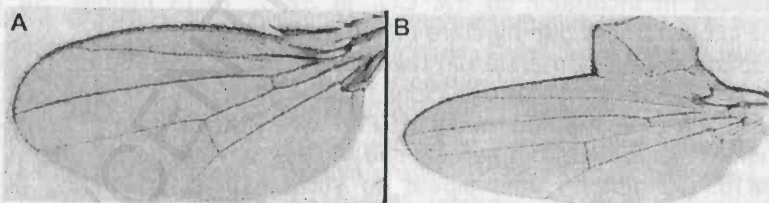


Fig.108. A-Aripa normală de *Drosophila*. B-Mutație *forked*.

Recombinarea mitotică urmărește realizarea de clone mitotice în care doar celulele de interes sunt homozigote pentru cromozomul mutagenizat, în timp ce restul organismului este heterozigot. Clonele mitotice s-au realizat inițial prin mutagenză cu raze X.

În prezent, o cale mult mai eficientă este folosirea Flp recombinazei. Pentru astfel de experimente se folosesc markeri genetici care alterează vizibil fenotipul

celular, fără a afecta modelul creșterii celulare. În această categorie intră acei markeri care afectează pigmentarea cuticulară generală, ca *yellow*⁹ (*y*), morfologia perilor senzoriali, de exemplu *singed*¹⁰ (*sn*) sau *forked*¹¹ (*f*) (Fig.108) sau morfologia perilor simpli ca *multiple wing hairs*¹² (*mwh*). Perii senzoriali sunt structuri inervate, în timp ce perii simpli sunt formați din celule individuale.

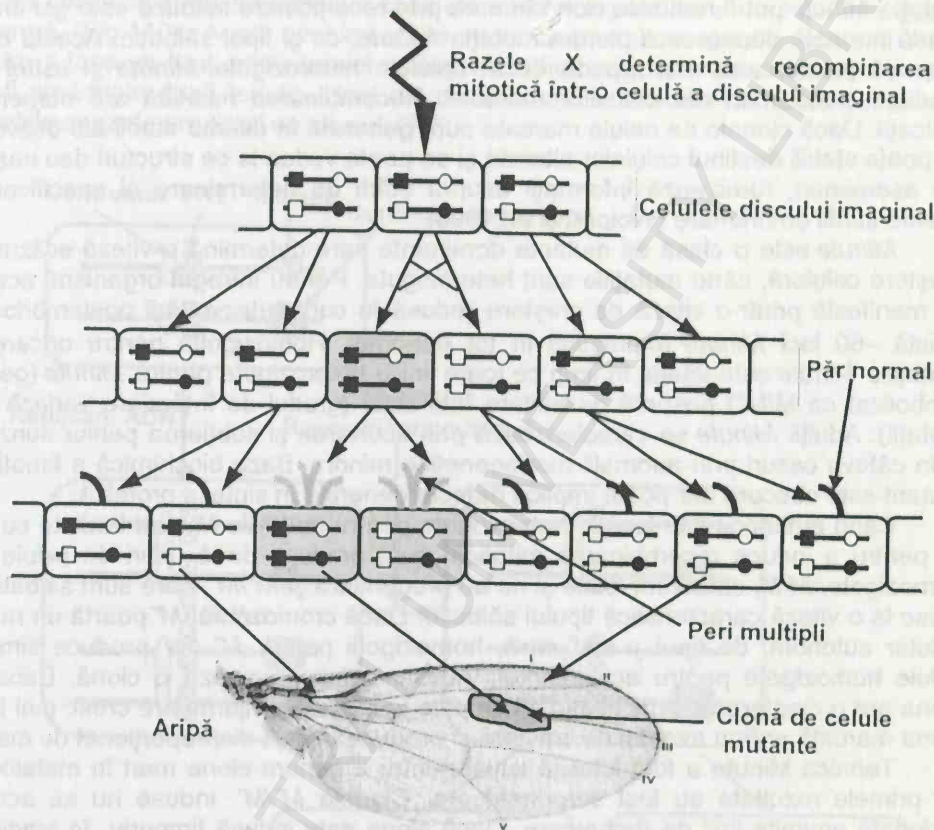


Fig.109. Schema obținerii de clone celulare mutante în aripa de *Drosophila*, prin recombinație mitotică. I-V=vene ale aripilor.

Recombinația mitotică poate genera o singură celulă cu o constituție genetică unică, ce va fi moștenită de toți descendenții. Descendenții celei vor forma un anumit teritoriu, numit clonă. Clona marcată poate fi identificată folosind de exemplu mutația *multiple wing hairs*. Dacă într-o larvă heterozigotă este generată prin recombinație

⁹Genă denumită după fenotipul mutant, caracterizat prin culoarea galbenă a cuticulei.

¹⁰Genă denumită după fenotipul mutant. La musculițele mutante perii apar ca și când ar fi arși. *singed*=a pârli, a arde ușor, engl.

¹¹Genă denumită după fenotipul mutant, caracterizat prin bifurcarea aripii.

¹²Genă denumită după fenotipul mutant, în care apar peri multipli pe aripi.

mitotică o celulă homozigotă pentru această mutație toți descendenții vor avea peri multipli (Fig.109).

Clonele epidermale marcate prin această metodă sunt de obicei mici, deoarece există puțină proliferare celulară după recombinare. Clone mai mari pot fi realizate folosind tehnica *Minute*. Celulele purtătoare ale unei mutații în gena *Minute* cresc foarte încet, comparativ cu cele normale. Folosind musculițe heterozigote pentru mutația *Minute* pot fi realizate clone în care prin recombinare mitotică este generată o celulă normală deoarece a pierdut mutația *Minute*, ca și tipul sălbatic. Acestă celulă normală proliferază mai repede decât celulele heterozigote *Minute* și astfel sunt produse clone mari ale celulelor marcate. Recombinarea mitotică are numeroase aplicații. Dacă clonele de celule marcate sunt generate în diferite stadii ale dezvoltării se poate stabili destinul celulelor alterate și se poate vedea la ce structuri dau naștere. De asemenea, furnizează informații asupra stării de determinare și specificare în diferite stadii embrionare (Wolpert și al., 1998).

Minute este o clasă de mutante dominante care determină o viteză scăzută de creștere celulară, când mutațiile sunt heterozigote. Pentru întregul organism, aceasta se manifestă printr-o viteză de creștere redusă în cursul dezvoltării postembrionare. Există ~60 loci *Minute* împrăștiați în tot genomul. Homozigoția pentru oricare din mutațiile *Minute* este letală, în timp ce toate liniile heterozigote pentru *Minute* (genotip simbolizat ca M/M^*) prezintă dezvoltare întârziată (gradul de întârziere variază între mutații). Adulții *Minute* se caracterizează prin scurtarea și subțierea perilor senzoriali și în câteva cazuri prin anomalii morfogenetice minore. Baza biochimică a fenotipului mutant este obscură dar poate implica defecte generale în sinteza proteică.

Când embrionii sau larvele heterozigote pentru mutațiile M sunt iradiate cu raze X , pentru a induce recombinarea mitotică, sunt produse două tipuri de celule fiice homozigote: M/M , care sunt letale și nu au progenitură și M^*/M^* , care sunt sălbatice și cresc la o viteză caracteristică tipului sălbatic. Dacă cromozomul M^* poartă un marker celular autonom, de tipul y sau mwh , homozigoții pentru M^* vor produce simultan celule homozigote pentru acel marker. Aceste celule formează o clonă. Deoarece clona are o creștere de tip sălbatic, în timp ce celulele înconjurătoare cresc mai încet, clona marcată are un avantaj de creștere și produce o plajă disproporționat de mare.

Tehnica *Minute* a fost folosită inițial pentru a genera clone mari în metatorace, iar primele rezultate au fost surprinzătoare. Clonele M^*/M^* induse nu au acoperit niciodată anumite linii de demarcare. Dacă clona este indusă timpuriu, în stadiul de blastoderm, zona marcată poate ocupa fie partea anterioară a mesonotumului și partea anterioară a aripii sau regiunile posterioare ale notumului și aripilor. Linia de demarcare în aripă este perfect dreaptă pentru clonele mari și se poate extinde sute de celule. Interesant, această linie a restricției clonale nu corespunde cu nici un aspect morfologic evident al aripii (deși poate avea o semnificație funcțională specială, ca punct de flexare a aripii în timpul zborului). Mai târziu, în dezvoltare apare a doua linie de restricție. Clonele noi sunt restrânse fie la suprafața dorsală fie la cea ventrală a aripii. Grupurile de celule care dau naștere unei astfel de regiuni au fost denumite compartimente, iar procesul prin care grupurile de clone sunt restricționate, "compartimentalizare".

O cale mai eficientă de a genera clone este aceea de a folosi Flp recombinaza din plasmida 2μ de drojdie. Când este integrată în genomul de *Drosophila* aceasta mediază recombinarea eficientă între situsuri țintă, numite situsuri FRT^{13} .

Flp recombinaza mediază recombinaerea situs specifică între situsurile *FRT* în cursul replicării plasmidei 2 μ de drojdie. Recombinarea mediată de Flp poate fi folosită pentru a genera clone mitotice, în care situsurile *FRT* transgenice sunt la poziții identice pe cromozomii omologi. Dacă recombinaerea situs specifică între cromozomii omologi are loc după replicarea ADN și cromatidele fiice segregă corespunzător, regiunea din brațul cromozomial așezată distal de situsul *FRT* devine homozigotă, fiecare celulă fiică moștenind două copii ale acestei regiuni de la unul din cromozomii parentali (Fig.110). Acest eveniment de recombinaere situs specific poate fi folosit pentru a face un braț cromozomial mutagenizat homozigot, în care clonele de celule pot fi apoi triate după fenotip. Unul din dezavantaje este acela că nu se pot detecta mutațiile așezate proximal de situsul *FRT*.

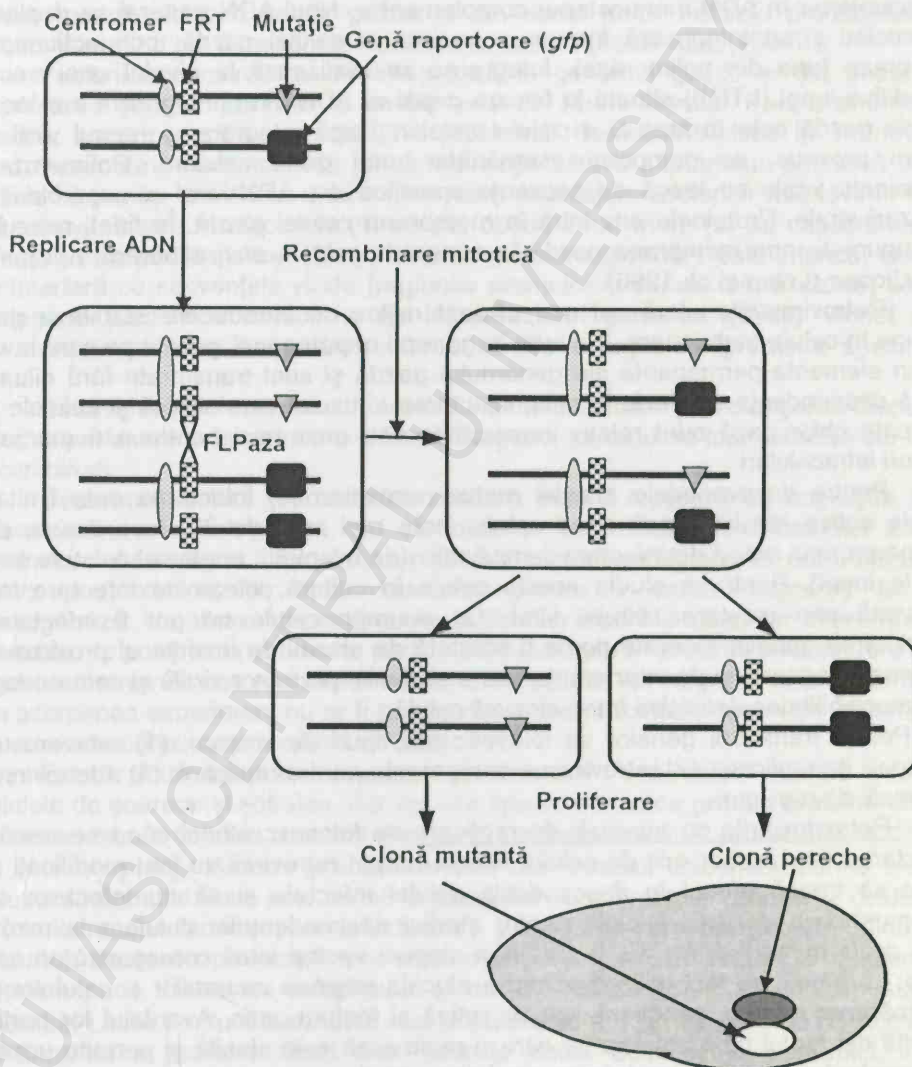


Fig.110. Schema obținerii de clone mitotice în discurile imaginale de la *Drosophila* folosind Flp recombinaza. (Adaptată după Tabata,2001).

B. Infectarea cu vectori retrovirali

Retrovirusurile sunt formate dintr-un genom ARN, înconjurat de un miez proteic și acoperit de o anvelopă proteolipidică. Molecula de ARN virală codifică trei clase de proteine: (1) polimeraze (pol), strâns asociate cu ARN, reprezentate de revers transcriptaza și integraza; (2) antigene asociate de grup, (gag), ce formează un miez; (3) proteine ale anvelopei (env), incluse în membrana lipidică. Există numeroase tipuri de retrovirusuri, însă doar trei au fost folosite pentru transferul genelor: virusul leucemiei murine, virusul sarcomului Rous, virusul necrozei splenice.

Pentru a iniția o infecție, proteinele env se leagă de proteine specifice din membrana celulei gazdă, proces care determină endocitoza virusului. Ulterior, anvelopa (capsida virală) este îndepărtată de enzimele celulare. Polimeraza virală numită revers transcriptază copiază informația genetică conținută în ARN monocatenar în ADN monocatenar complementar. Noul ADN generat se deplasează în nucleu și se integrează într-un cromozom al celulei gazdă, prin acțiunea unei integreze (una din polimeraze). Integrarea se realizează la nivelul unor secvențe repetitive lungi (LTR¹⁴) situate la fiecare capăt al ADN viral. Integrarea are loc când celula gazdă este în faza S a ciclului celular. După integrare, genomul viral numit acum provirus, se comportă asemănător unei gene celulare. Polimerazele și proteinele virale se leagă de secvențe specifice din ARN viral și assemblează noi miezuri virale. Proteinele env intră în membrana celulei gazdă. În final, miezul viral înmugurește prin membrana gazdă în zonele bogate în env, eliberând noi particule infecțioase (Leber și al., 1996).

Retrovirusurile oferă cel mai eficient mijloc de introducere stabilă a genelor străine în celule embrionare. Ele sunt în general nepatogene, genele pe care le conțin devin elemente permanente ale genomului gazdă și sunt transferate fără diluare, la toată descendența celulară. În plus, injectarea virusului este simplă și celulele pot fi marcate chiar dacă sunt relativ inaccesibile sau prea mici pentru a fi marcate cu trasori intracelulari.

Printre dezavantajele acestei metode amintim: (1) infectarea este limitată la celule active mitotic. Dacă ciclul celular este mai lung de 20 de ore este dificilă obținerea unui raport de infectare semnificativ (de exemplu, unele celule stem se divid foarte încet). Pentru a studia aceste celule în cultură, viteza de infectare trebuie crescută prin creșterea titrului viral. (2) anumite celule nu pot fi infectate; (3) exprimarea genelor inserate poate fi afectată de situsul de inserție al provirusului în cromozomii gazdă și de interferența dintre regiunile promotor virale și cele endogene; (4) imposibilitatea detectării într-o singură celulă.

Pentru transferul genelor se folosesc trei tipuri de virusuri: (1) retrovirusuri cu anomalii de replicare; (2) retrovirusuri competente pentru replicare; (3) adenovirusuri cu anomalii de replicare.

Retrovirusurile cu anomalii de replicare se folosesc atunci când se urmărește infectarea unui număr mic de celule. Acești vectori retrovirali au fost modificați astfel încât să treacă numai în descendenții celulei infectate și să nu infecteze celule înconjurătoare. Au fost folosite pentru studiul descendențelor celulare la rozătoare încă de la mijlocul anilor 1980 și rămân singurii vectori virali corespunzători acestui scop. La gâină, au fost utilizați pentru a elucidă originea neuronilor și celulelor gliale din măduva spinării, ganglionii spinali, retină și tectum optic. Avantajul lor particular rezultă din faptul că marcarea pe care o realizează este stabilă și permite urmărirea descendențelor celulare pe tot parcursul dezvoltării.

¹⁴Long Terminal Repeats

Retrovirusurile competente pentru replicare conțin genele structurale virale și alte secvențe reglatoare importante intacte.

Adenovirusurile cu anomalii de replicare sunt asemănătoare în unele privințe retrovirusurilor (legarea la receptorii celulari, intrarea în endozomi, migrarea în nucleul celulei gazdă, etc.) Cu toate acestea, adenovirusurile prezintă următoarele particularități: (1) genomul viral conține ADN și nu ARN; (2) în nucleul celulei gazdă, ADN adenoviral este menținut în formă liniară și nu se integrează în cromozomi. Astfel, adenovirusul nu se poate replica în celulă și este diluat în cursul diviziunilor celulare. Pe de altă parte, poate infecta celulele post-mitotice și nu determină mutații, care sunt în cazuri rare, dominante sau carcinogene; (3) învelișul adenoviral este format din proteine și nu conține lipide. Datorită acestui aspect, particulele adenovirale sunt mult mai stabile și mai ușor de concentrat decât cele retrovirale; (4) adenovirusurile lizează celula gazdă și din acest motiv celulele producătoare de adenovirusuri nu pot fi menținute continuu în cultură (Leber și al., 1996).

Vectorii adenovirali nu se integrează în genomul gazdă și din acest motiv exprimarea genelor pe care le conțin este de scurtă durată. Pentru embrionii de pasăre, acest aspect nu reprezintă o problemă. Genele introduse în adenovirusuri sunt exprimate în embrionii de găină, cel puțin câteva săptămâni, perioadă de timp suficientă pentru realizarea unui experiment. Avantajele vectorilor adenovirali față de cei retrovirali sunt următoarele (1) se pot obține titruri mari; (2) au capacitatea de a infecta celule post-mitotice; (3) exprimarea genelor raportoare este intensă, deoarece nu interferează cu secvențele virale (regiunile promotor virale au fost excizate) sau cele endogene (deoarece virusul nu se integrează în genomul gazdă). Acest aspect favorizează folosirea lor pentru testarea *in vivo* a regiunilor promotor specifice de țesut.

Dezavantajele vectorilor adenovirali includ toxicitatea și declanșarea răspunsului imun la proteinele adenovirale codificate de gene, care nu au fost excizate din vectorii recombinanți.

Deoarece vectorii retrovirali competenți pentru replicare se împrăstie iar cei adenovirali nu se integrează, nu se folosesc în studiul descendențelor celulare. Vectorii adenovirali pot fi folosiți în urmărirea migrărilor celulare. Ei pot fi introduși în celule post-mitotice, de tipul neuronilor pentru a urmări migrarea lor după neurogeneză. Un alt avantaj este acela al titrurilor mari ale stocurilor adenovirale. De exemplu, se pot injecta suficiente particule adenovirale în lumenul unei singure somite pentru a marca 20 sau mai multe celule, care ulterior vor migra la nivelul membrilor. Un asemenea experiment nu ar fi posibil cu vectori retrovirali, deoarece un lumen plin de retrovirusuri ar conține câțiva virioni activi.

Există două tipuri de virusuri: (1) virusurile "ecotropice" murine infectează celulele de șoarece și șobolan, dar nu alte specii, deoarece produc proteine env care recunosc numai celulele rozătoarelor. Cea mai populară linie producătoare de acest tip este Ψ_2 și Ψ_{cre} . Ambele produc derivate ale virusului leucemiei murine Moloney. Virusul sarcomului Rous este folosit la găină dar nu infectează toate liniile celulare; (2) virusurile murine "amfotropice" infectează o gamă largă de specii (iepure, găină, unele primare), deoarece proteinele env recunosc și se leagă de receptorii celulari de la diferite specii. Deoarece infectează și omul sunt necesare măsuri de siguranță speciale. Liniile producătoare cele mai populare sunt Ψ_{am} , Ψ_{crip} și PA317. Acestea au tendința de a produce titruri mai scăzute decât echivalenții ecotropici. Ambele categorii de virusuri pot conține gena *lacZ*.

Virusurile nu pot penetra bine țesuturile, astfel încât este important să se evite barierele dintre situsul injectării și celulele ce trebuiesc infectate. De exemplu, un virus nu penetrează membranele bazale.

Folosirea retrovirusurilor pentru marcarea unei descendențe celulare implică trei etape: (1) generarea vectorilor retrovirali și introducerea lor într-o linie celulară; (2) producerea și titrarea retrovirusului; (3) verificarea contaminării cu virus "ajutător"; (4) introducerea virusului în celulele embrionare și analiza clonelor marcate.

Pentru a genera vectori cu anomalii de replicare se îndepărtează genele esențiale pentru replicare și se înlocuiesc cu alte gene, ce permit identificarea celulelor care poartă genomul viral (Price, 1993).

Deoarece vectorii retrovirali cu anomalii de replicare nu conțin genele structurale ce codifică componentele necesare formării particulei virale, acestea sunt furnizate prin complementare. Producerea de virioni infecțioși fără gene virale esențiale necesită folosirea unei linii celulare de împachetare. Acestea sunt linii fibroblastice stabile, transfectate cu vectori de exprimare, ce codifică proteine structurale dar nu au secvențele necesare pentru asamblarea ARN viral într-un nou miez viral. Fibroblastele acumulează proteinele structurale virale, dar nu pot face virusuri noi. Pentru a produce virioni cu anomalii de replicare se folosesc celule ajutătoare care sunt transfectate cu o plasmidă, în care LTR flanchează semnalele de împachetare și gena exogenă. Această plasmidă direcționează exprimarea ARN care va fi împachetat de proteinele structurale virale pentru a forma virioni infecțioși (Cepko și al., 1993).

Linii celulare producătoare de virusuri pot fi construite în trei moduri: (1) cel mai adesea o linie celulară ajutătoare caracterizată este transfectată cu plasmide, ce codifică retrovirusul defectiv și un marker selectabil, de tipul rezistenței la neomicină (neo^R). Acestea pot fi pe aceeași plasmidă sau pe plasmide separate. Celulele transfectate stabil sunt izolate prin selecția pe antibiotice și apoi subclonate pentru a obține linii clonale. Câteva linii sunt testate pentru titrul viral și cele mai bune sunt multiplicare, pasate sau înghețate pentru stocare; (2) fibroblastele pot fi cotransfectate cu plasmide ajutătoare și virale. În acest caz o linie producătoare stabilă este selectată într-o singură etapă; (3) celulele ajutătoare pot fi infectate tranzitoriu cu plasmide virale, virusul fiind colectat din mediu la 3-4 zile după transfecție. Această metodă evită perioadele lungi de așteptare necesare pentru selecție și subclonare și permite producerea rapidă de virus. Se lucrează bine cu linii celulare care pot fi transfectate cu eficiență mare, de tipul QT6.

Fibroblastele producătoare de virusuri pot fi menținute simplu în mediu cu ser. Ele pot fi pasate nedefinit și congelate pentru stocarea pe termen lung. La găină pentru studiul descendenței celulare s-au folosit virusurile LZ10 și LZ12. Ambii vectori au ca genă exogenă *lacZ*, de la *Escherichia coli*. LZ10 este derivat din virusul sarcomului Rous și este produs de fibroblastele de prepeliță QT6. LZ12 derivă din virusul leucemiei murine Moloney și este crescut pe fibroblaste de șoarece PA317, care derivă din fibroblastele 3T3. Mediile sunt ușor diferite pentru aceste două tipuri, dar în general metodele pentru prepararea virusului sunt similare.

Protocol experimental de injectare a vectorilor retrovirali în embrionii de șobolan

1. Șobolanii gestați sunt anesteziați prin injectare intraperitoneală cu 0,68 ml/250 g greutate corporală dintr-un amestec 1:1:2 hypnorm:hypnovel:apă.
2. Se secționează tegumentul și cavitatea abdominală printr-o incizie pe linia mediană.

3. Se evidențiază uterul, care este scos ușor din cavitatea abdominală, mai întâi un corn uterin și apoi celălalt.
4. Pentru vizualizarea embrionilor se plasează o lampă cu fibre optice în spatele lor. Embrionii se văd foarte clar, astfel încât se pot injecta prin peretele uterin fără leziuni majore. Injectarea se face cu o seringă manuală Hamilton sau cu o micropipetă atașată la micromanipulator. În fiecare caz se pot introduce volume mai mici de 1 μ l virus/polybrene în diferite regiuni embrionare (Fig.111).

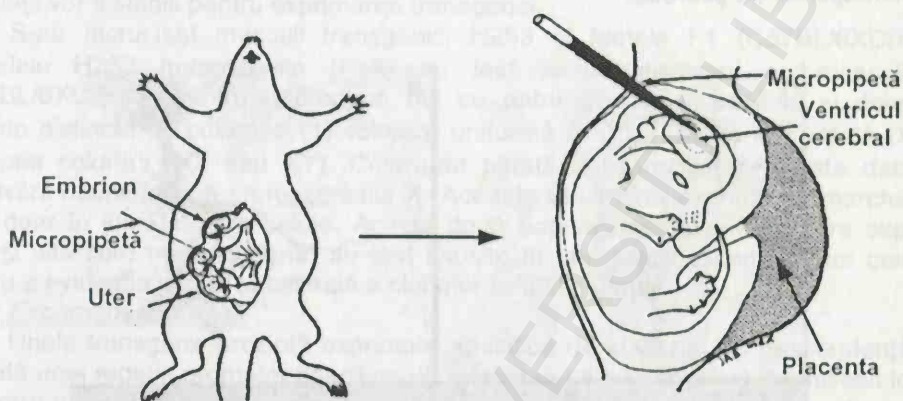


Fig.111. Schema metodei de introducere a vectorilor retrovirali în ventriculul cerebral al unui embrion de șobolan de 16 zile.

5. După injectare, uterul este introdus cu grijă în cavitatea abdominală și incizia este închisă prin sutură. Animalul își revine în ~45 minute. Femelele gestante sunt crescute până în stadiul dorit, după care sunt sacrificate pentru recoltarea țesuturilor de interes, care sunt procesate pentru histochimie. Dacă markerul histochimic este β -galactozidaza, sacrificarea se realizează prin perfuzarea inimii cu fixator. În figura 112 se pot observa în microscopia optică și electronică, celule pozitive *lacZ*, după injectarea virusului în ventriculii cerebrali.

C. Recombinare *lacZ*

Exprimarea transgenei *lacZ* variază în funcție de: (1) natura elementelor reglatoare (promotor sau enhancer) ce conduc exprimarea genei; (2) numărul de copii active; (3) domeniul cromozomial unde este integrată transgena. Alegerea transgenei este dictată de scopul urmărit. Există trei tipuri de exprimare a transgenelor *lacZ*: (1) ubicuă; (2) mozaică; (3) restrânsă;

Exprimare ubicuă

Unele transgene au exprimare ubicuă, independentă de descendențele celulare. De exemplu, în șoarecii transgenici unde gena *lacZ* este reglată de regiunea promotor a hidroximetilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductazei, transgena este exprimată în cursul dezvoltării la niveluri mari în toate descendențele celulare. Un comportament asemănător are transgena ROSA- β -*geo* produsă prin mutagenезă situs specifică și raportorul *lacZ* condus de regiunea promotor a actinei- β umane. Transgenele exprimate ubicu furnizează un marker ideal pentru analiza descendențelor celulare,

astfel încât progenitorii descendenței sau celulele fondatoare pot fi izolate ca o populație celulară pură.

Linia transgenică H253 este un exemplu de exprimare ubicuă a unei transgene X linkate. Prin încrucișarea femelelor homozigote X^*X^* cu masculii X^*Y (unde X^* reprezintă cromozomul X care poartă transgena) se produc embrioni transgenici (X^*X^* , X^*Y) în care β -galactozidaza este exprimată la niveluri mari în toate țesuturile și progeniturile, pe tot parcursul dezvoltării. Această serie de încrucișări a produs o linie transgenică ubicuă, care a fost utilă în studiile realizate pe embrionii post-implantaționali de șoarece.

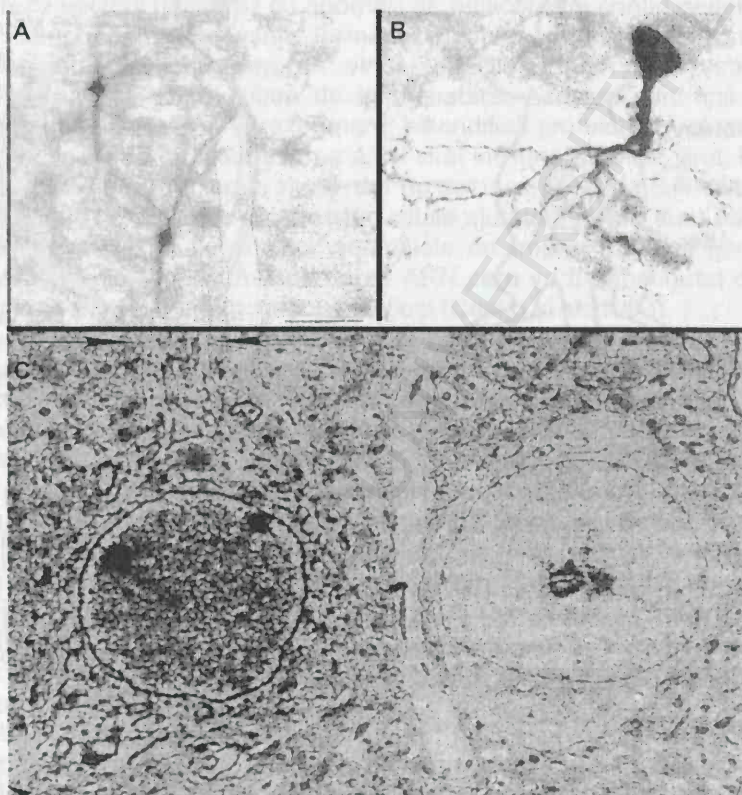


Fig.112. A-Neuroni *lacZ* pozitivi în cortexul cerebral de șobolan, rezultați prin injectarea retrovirusului în ventriculii cerebrali, în a 16 zi embrionară. B-Neuron din bulbul olfactiv pozitiv pentru β -galactozidază. În figura A și B neuronii sunt observați *in toto*. C-Imagine de microscopie electronică, în care se remarcă un neuron *lacZ* pozitiv (stânga) și unul nemarcat (dreapta). Nucleul și membrana nucleară sunt intens pozitive. În citoplasmă produsul de reacție este asociat preferențial cu reticulul endoplasmatic, care se extinde în dendrita apicală (săgeți). (După Pavlath și Luskin, 1999).

În unele cazuri de cartare a descendențelor celulare poate fi folositoare integrarea transgenei într-un cromozom specific. Transgenele exprimate în același model ca genele vecine la situsul integrării vor furniza un marker pentru modele de exprimare specifice de țesut. De exemplu, transgenele care se integrează în

cromozomul X se pot comporta ca genele endogene X-linkate. Printre transgenele X-linkate cunoscute, activitatea transgenei *HMG-nls-lacZ* apare a reflecta fidel activitatea cromozomului X.

Exprimare mozaică

La femela de șoarece ce poartă transgena *lacZ* doar pe un cromozom X, inactivarea unui cromozom X în cursul dezvoltării embrionare generează două populații celulare, una ce exprimă transgena X-linkată și alta care nu o exprimă. Pentru că starea inactivării unui cromozom X este moștenită, descendenții fiecărei populații vor fi stabili pentru exprimarea transgenei.

S-au încrucișat masculi transgenici H253 și femele F1 (C57BL/6XDBA/2). Femelele H253 heterozigote (X*X) au fost încrucișate apoi cu masculi F1 (C57BL/6XDBA/2) pentru a produce pui cu patru genotipuri posibile și doar trei modele distincte de colorare: (1) colorare uniformă (X*Y); (2) colorare pătată (X*X); (3) lipsa colorării (XX sau XY). Colorarea pătată a șoarecilor X*X este datorată inactivării neuniforme a cromozomului X. Aceasta determină exprimarea markerului *lacZ* doar în jumătate din celule. Aceste două populații celulare (una care exprimă *lacZ* și alta care nu o exprimă) au fost folosite în analizele descendențelor celulare pentru a evidenția istoria ancestrală a clonelor înrudite spațial.

Exprimare restrânsă

Unele transgene prezintă exprimare specifică de stadiu și de descendență, fie datorită unei regiuni promotor specifice de țesut sau ca o consecință a situsului lor de integrare unic. De exemplu, în șoarecii transgenici *Wnt1-lacZ* transgena este reglată de elementul enhancer din regiunea 3' a genei *Wnt1*, care direcționează exprimarea specifică în partea dorsală a tubului neural și ulterior în creștele neurale derivate din această regiune. Alt exemplu sunt șoarecii transgenici R197 în care gena *lacZ* este exprimată în principal în mușchi, începând din stadiul organogenezei timpurii, ca o consecință a situsului său de integrare. O cerință necesară pentru folosirea acestor șoareci și a oricărei linii transgenice este stabilirea modelului de exprimare spațial și temporal al transgenei.

Transgena *lacZ* este exprimată segmentat, în principal în descendența miogenă din embrionii de 8 zile jumătate. După identificarea progeniturilor transgenice aceste animale sunt încrucișate cu hibrizi netransgenici (C57BL/6XDBA) sau alți șoareci transgenici pentru a produce embrioni transgenici. În această linie transgenică embrionii homozigoți mor în cursul perioadei post-implantaționale. Pentru a evita letalitatea, șoarecii gestați sunt sacrificați la diferite stadii de gestație, astfel încât se poate analiza dimensiunea și genotipul embrionilor/fetușilor. O reducere a dimensiunii nou-născuților heterozigoți și absența homozigoților după genotipare indică că homozigoții nu supraviețuiesc la termen (Trainor și al., 1999).

În figura 113 este schematizat protocolul experimental utilizat pentru analiza descendențelor celulare folosind embrioni transgenici de 6 zile jumătate. Se izolează un grup de 5-10 celule de la un embrion transgenic donor, care este grefat într-un embrion gazdă, normal. Embrionul gazdă este cultivat până în stadiul dorit (de exemplu, 8 somite) și apoi colorat histochimic, împreună cu embrionul donor și cu unul martor pentru evidențierea β -galactozidazei. După incubarea cu substratul pentru β -galactozidază, se colorează doar embrionul donor și celulele provenite din acesta în embrionul gazdă. Embrionul martor, care nu este transgenic nu se colorează.

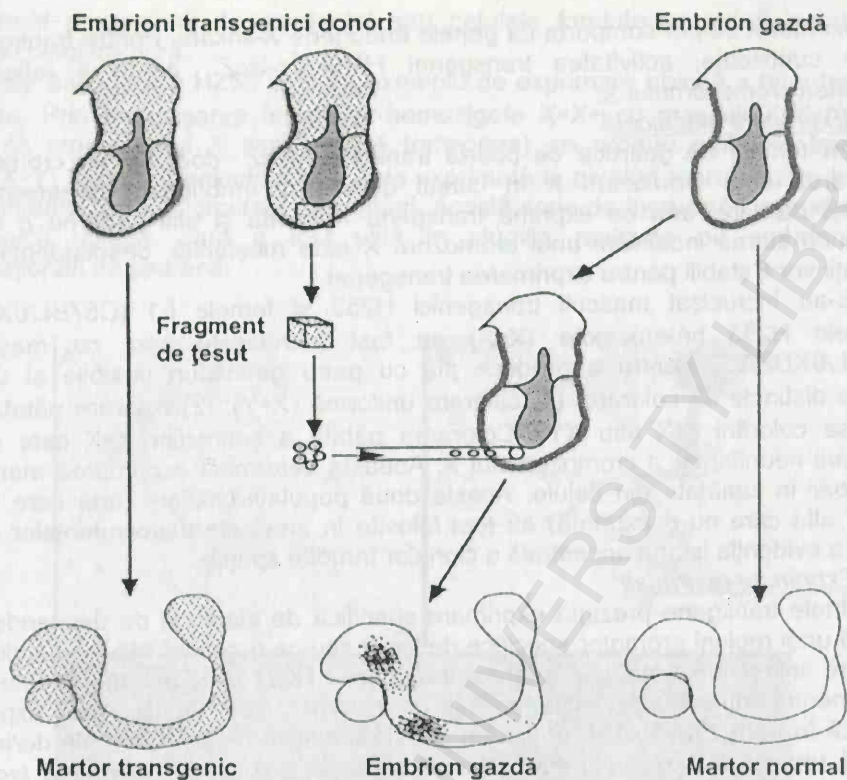


Fig.113. Reprezentarea schematică a protocolului folosit în metodele genetice de urmărire a descendențelor embrionare.

D. Recombinare Cre-*loxP*

Pentru studierea descendențelor embrionare se poate utiliza o variantă a sistemului Cre-*loxP*, prezentat în capitolul 2.

Metoda a fost folosită pentru a studia originea embrionară a celulelor din pancreasul endocrin (Herrera, 2000).

Pancreasul endocrin conține patru tipuri celulare: (a) celule α , producătoare de glucagon; (b) celule β , care sintetizează insulină; (c) celule δ , care produc somatostatina; (d) celule PP, implicate în sinteza unei polipeptide pancreatice. Spre deosebire de adult, unde fiecare celulă secretă un singur hormon, în pancreasul embrionar celulele pot conține simultan doi hormoni, aspect care sugerează existența unei celule precursoare comune.

Pentru a stabili originea celulelor pancreasului endocrin prin metoda Cre-*loxP* s-au generat prin tehnica injectării în pronuclei, două tipuri de șoareci transgenici.

Șoarecii transgenici 1 conțin o transgenă formată din următoarele componente: (a) regiunea promotor a genei insulinei (β -specific) sau regiunea promotor a genei glucagonului (α -specific); (b) secvență STOP de terminare a transcripției, "floxată", adică flancată de două situsuri *loxP*; (c) gena raportoare *lacZ*. Transgena nu poate fi exprimată în celulele α sau β datorită secvenței STOP. Exprimarea transgenei

necesită îndepărtarea secvenței STOP, care se poate realiza numai în prezența recombinazei Cre.

Șoarecii transgenici 2 poartă o transgenă formată din gena care codifică recombinaza Cre, plasată sub controlul unui promotor activ în presupusele celule progenitoare. Expimarea transgenei 2 determină îndepărtarea secvenței STOP din prima transgenă și permite exprimarea *lacZ*, care poate fi detectată histochimic. În funcție de tipul de promotor folosit s-au realizat patru variante de șoareci transgenici 2: (a) promotor gena insulinei - Cre; (b) promotor gena glucagon - Cre; (c) promotor gena PP - Cre; (d) promotor *Pdx-1* - Cre. PDX-1¹⁵ este primul factor transcripțional exprimat în celulele stem pancreatice.

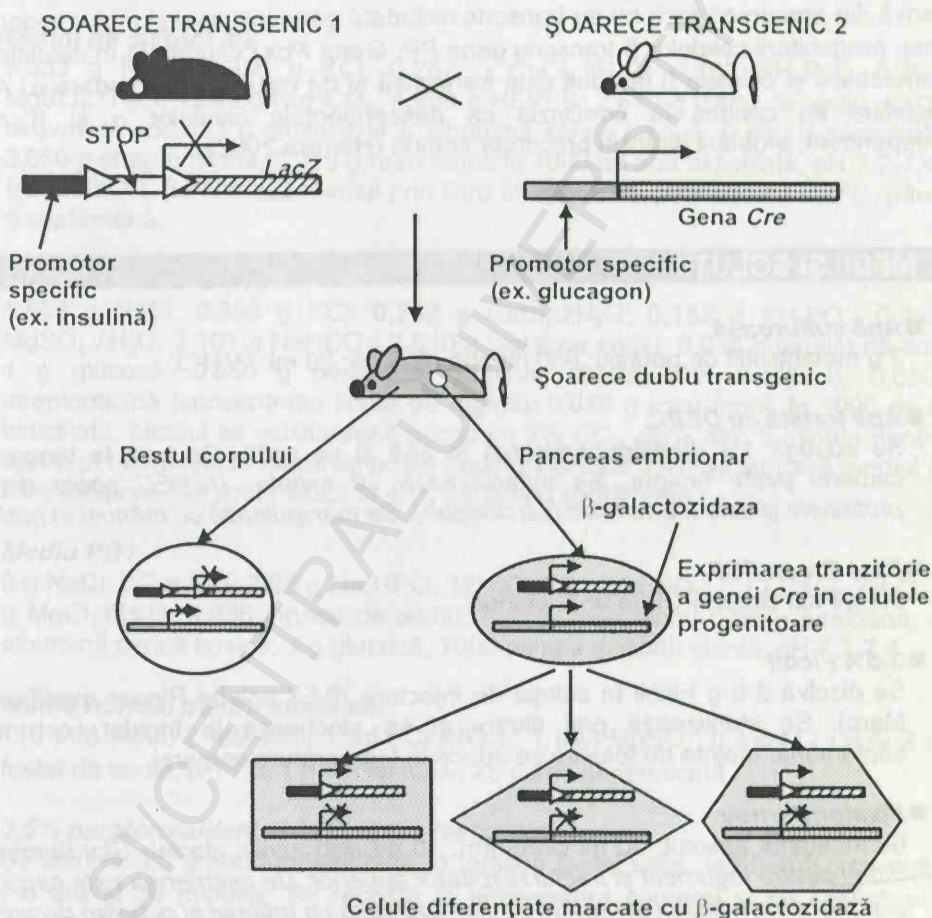


Fig.114. Marcarea descendenților celulare în pancreasul embrionar prin sistemul Cre-loxP. (Adaptată după Herrera,2002).

Prin încrucișarea șoarecilor care poartă prima transgenă cu cei care poartă o variantă a celei de-a doua transgene se obțin embrioni și nou-născuți, dublu-transgenici, care vor conține β -galactozidază numai în acele celule în care regiunea promotor din a doua transgenă devine funcțională și determină producerea recombinazei (Fig.114). De exemplu, în cursul embriogenezei, în celulele care exprimă prima dată insulina este activată varianta "a" (promotor gena insulinei - Cre) a transgenei 2, ce conduce la sinteza Cre. Tot în aceste celule, recombinaza Cre clivează secvența STOP din prima transgenă și permite transcrierea *lacZ*. În toate celelalte celule ale corpului această variantă a transgenei 2 este nefuncțională. Varianta "d" a transgenei 2 (promotor *Pdx1* - Cre) este exprimată în celulele precursorare din care derivă ulterior atât celulele α cât și cele β .

Folosind această strategie moleculară s-a demonstrat că celulele α și β adulte derivă din precursori care nu au transcris niciodată gena insulinei și a glucagonului. În plus, progenitorii celulelor β transcriu gena PP. Gena *Pdx1* exprimată în celulele stem pancreatice și celulele β la adult este transcrisă și de celulele precursorare α . Aceste rezultate au condus la concluzia că descendențele celulelor α și β rezultă independent, probabil dintr-un precursor comun (Herrera,2002).

V. MEDII ȘI SOLUȚII

■ **Apă sulfuroasă**

2 g metabisulfid de potasiu; 980 ml apă distilată; 20 ml 1N HCl.

■ **Apă tratată cu DEPC**

Se adaugă 1% diethylpirocarbonat în apă și se agită. Se lasă la temperatura camerei peste noapte. Se autoclavează 20 minute. *DEPEC poate denatura proteinele și este foarte toxic (carcinogen). Se manipulează cu mănuși în hotă.*

■ **Fast Green FCF**

0,1 g Fast Green FCF în 95% etanol.

■ **3-5% Ficoll**

Se dizolvă 3-5 g Ficoll în soluția de injectare (0,5X soluție Ringer modificată de Marc). Se sterilizează prin filtrare și se stochează la frigider, cel mult o săptămână. Înainte de folosire se aduce la temperatura camerei.

■ **Fixator Carnoy**

60 ml etanol absolut; 30 ml cloroform; 10 ml acid acetic glacial. *Cloroformul este iritant pentru tegument și tractul respirator superior. De asemenea este carcinogen și poate afecta ficatul și rinichii. Se manipulează cu mănuși și ochelari de protecție în hotă.*

■ **2,5% glutaraldehidă în tampon fosfat salin**

5 ml 25% glutaraldehidă în 45 ml tampon fosfat salin. Se păstrează 1-2 săptămâni la 4°C.

■ **Mediu Eagle modificat Dulbeco (DMEM)**

Soluții stoc: DMEM (Gibco, glucoză 4 g/l)

200 μ M glutamină

5000 μ g/ml penicilină/streptomicină

Soluție de lucru: Se dizolvă cu agitare ușoară conținutul unui pachet de pudră DMEM, în 4,75 l apă distilată. Se adaugă 11 g NaHCO_3 . Se aduce la 5 l cu apă distilată. Se ajustează pH-ul la 7,2-7,4 cu 1N NaOH sau 1N HCl. Sterilizare imediată prin filtrare. *pH-ul crește de obicei cu 0,1-0,3 unități după filtrare.* Înaintea folosirii în cultură, la 1 l DMEM se adaugă 10 ml soluție glutamină și 10 ml soluție penicilină. Soluții proaspete de glutamină și penicilină/streptomicină se adaugă la soluția de lucru după două săptămâni. Soluția de lucru poate fi păstrată, 4 săptămâni de la preparare, la 4°C.

■ **Mediu de cultură M2**

5,533 g NaCl; 0,356 g KCl; 0,252 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,162 KH_2PO_4 ; 0,293 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,349 g NaHCO_3 ; 4,969 g HEPES; 2,610 g lactat de sodiu; 0,036 g piruvat de sodiu; 1 g glucoză; 4 g albumină serică bovină; 0,060 g penicilină G; 0,050 g streptomicină; 0,010 g roșu fenol; la 1000 ml apă bidistilată, pH 7,2-7,4 cu 0,2 N NaOH. Se filtrează mediul prin filtru Millipore. Se poate stoca la 4°C, până la o săptămână.

■ **Mediu de cultură M16**

5,533 g NaCl; 0,356 g KCl; 0,252 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,162 g KH_2PO_4 ; 0,293 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,101 g NaHCO_3 ; 2,610 g lactat de sodiu; 0,036 g piruvat de sodiu; 1 g glucoză; 0,060 g penicilină G (conc. finală 100 unități/ml); 0,050 g streptomicină (concentrația finală 50 mg/ml); 0,010 g roșu fenol; la 1000 ml apă bidistilată. Mediul se echilibrează gazos cu 5% CO_2 , 95% aer, 5 minute pentru a ajusta pH-ul (această etapă se omite dacă pH-ul este 7,4). Se filtrează mediul prin filtru Millipore. Se poate stoca la 4°C, până la o săptămână.

■ **Mediu PB1**

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 2,88 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g KH_2PO_4 ; 0,13 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,036 g piruvat de sodiu; 0,01 g roșu fenol; 0,06 g penicilină; 4 g albumină serică bovină; 1 g glucoză; 1000 ml apă distilată sterilă, pH 7,3-7,4.

■ **Mediu normal pentru amfibieni**

110 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 1 mM MgSO_4 ; 0,1 mM EDTA; 2 mM fosfat de sodiu, pH 7,5; 1 mM NaHCO_3 ; 25 μ g/ml gentamicină.

■ **3,5% paraformaldehidă în tampon fosfat salin**

Se dizolvă 3,5 g paraformaldehidă în tampon fosfat salin, la 60-70°C, cu agitare (~o oră și 30 minute). Se răcește la temperatura camerei și se verifică pH-ul înainte de folosire. *Paraformaldehida se absoarbe rapid prin epidermă și este extrem de toxică pentru tegument, ochi și tractul respirator superior. Trebuie manipulată cu mănuși și ochelari de protecție în hotă.*

■ **Reactiv Schiff**

Se dizolvă 1 g de fucsină bazică în 200 ml apă distilată fierbinte. *Înainte adăugării fucsinei se ia vasul cu apă de pe flacără.* Se răcește soluția până la temperatura de 50° și se adaugă cu agitare, 2 g metabisulfid de potasiu. Se

răcește în continuare soluția până la temperatura camerei și se adaugă 2 ml acid clorhidric concentrat. *Din acțiunea HCl asupra metabisulfidului de potasiu rezultă bioxid de sulf, care reduce fucsina bazică la fucsina Schiff (leucofucsina).* Se amestecă și se adaugă 2 g cărbune activ. Se lasă peste noapte la temperatura camerei, la întuneric. Se filtrează prin filtru Whatman No.1 când soluția devine incoloră sau ușor gălbuie. Se stochează la 4°C, ferită de lumină.

■ **Ser de șobolan**

Se anesteziază un șobolan cu 5% halotan, după care se recoltează sânge din aortă, cu o seringă neheparinizată cu ac G20. Se împarte sângele în tuburi de centrifugă de 15 ml și se centrifughează la 3000 rpm, 10 minute. Se prinde cheagul de fibrină cu o pensă sterilizată la flacără și se răsucesce pentru a elibera serul de cheag. Se transferă serul în alt tub de centrifugă cu ajutorul unei pipete Pasteur autoclavată și se centrifughează din nou la 3000 rpm, 10 minute. Se colectează aseptice serul și se stochează la -20°C.

■ **Soluție Ringer modificată de Marc**

Soluție stoc 10X: Se amestecă 58,4 g NaCl și 12 g HEPES. Se adaugă apă până la 700 ml și se ajustează pH-ul la 7,6. Se adaugă 1,5 g KCl; 2,4 g MgSO₄·7H₂O; 0,4 g EDTA. Se aduce la 1 litru. Se sterilizează prin filtrare și se stochează la frigider câteva luni. Se aduce la temperatura camerei înainte de folosire.

Soluție stoc antibiotice 200X: 10 mg/ml gentamicină. Soluția se sterilizează prin filtrare și se stochează la -20°C. Se adaugă în mediu la o concentrație de 50 μg/ml.

■ **Soluție Steinberg**

60 mM NaCl; 0,67 mM KCl; 0,34 mM Ca(NO₃)₂; 0,83 mM MgSO₄; 10 mM HEPES, pH 7,4.

■ **Soluție pancreatină-tripsină**

0,5 g pancreatină; 0,1 g tripsină; 0,1 g polivinilpirolidonă (opțional); 20 ml soluție Tyrode fără Ca⁺⁺/Mg⁺⁺. Suspensia este dificil de sterilizat prin filtru Millipore de 0,45 μm, fără centrifugare ușoară sau prefiltrare prin filtru Whatman No.1. Se stochează steril, în porții mici, la -20°C.

■ **Soluție Tyrode acidă**

0,8 g NaCl; 0,02 g KCl; 0,024 g CaCl₂·2H₂O; 0,01 g MgCl₂·6H₂O; 0,1 g glucoză; 0,4 g polivinilpirolidonă; pH 2,5. Se sterilizează prin filtrare, se alicotează și se stochează la -20°C. *Polivinilpirolidona crește vâscozitatea și reduce adeziunea embrionilor.*

■ **Tampon fosfat salin**

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄; 500 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul cu HCl, după care se aduce la 1000 ml cu apă distilată. Când se folosește pentru cultura de celule pH-ul este 7,2. Pentru alte scopuri pH-ul este 7,4.

■ **Tris-EDTA**

Soluție stoc: 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA (pH 8).

CAPITOLUL

4

METODE DE CARACTERIZARE A INDUCȚIILOR EMBRIONARE

Inducția reprezintă procesul prin care o celulă, sau un grup de celule embrionare influențează diferențierea și comportamentul altor celule. Studiul interacțiilor inductive necesită identificarea atât a țesuturilor inductoare cât și a celor induse. Identificarea semnalului ca și studiul mecanismelor moleculare care guvernează inducțiile embrionare necesită dezvoltarea unor tehnici prin care se testează diferite preparate și factori. Embrionii amfibienilor au fost folosiți pentru a identifica și defini o serie de inducții embrionare. Două din acestea, inducția mezodermului și inducția neurală sunt cruciale în formarea corpului vertebratelor și au fost descrise prima dată în embrionii de amfibieni.

Interacțiile inductive pot fi mimate *in vitro* prin asocierea țesuturilor.

I. INDUCEREA MEZODERMULUI ÎN CULTURĂ - METODA CALOTEI ANIMALE

Metoda a fost imaginată de Nieuwkoop¹ și folosită pentru identificarea primei molecule capabilă să inducă mezoderm (FGF²). În momentul fecundării, oul de amfibian prezintă diferențe de-a lungul axei antero-posterioare. În acest sens s-a constatat că atunci când explantele din diferite regiuni ale blastulei timpurii sunt cultivate într-un mediu simplu, care conține sărurile necesare, țesutul din emisfera animală va forma o sferă de celule epidermale, în timp ce explantele din emisfera vegetativă formează endoderm. Acest comportament sugerează că tot ectodermul și majoritatea endodermului sunt specificate de factori maternali și nu există dovezi că semnale din alte regiuni embrionare sunt necesare pentru determinarea lor. Excepție de la această regulă face endodermul care formează zona marginală³.

Inducția mezodermului la amfibieni poate fi demonstrată experimental. Dacă se recoltează un fragment mic de țesut din emisfera animală a blastulei, așa numita calotă animală, și se cultivă *in vitro*, ea va forma ectoderm. În schimb, dacă se pune

¹Pieter Nieuwkoop, embriolog olandez.

²Fibroblast growth factor, factor de creștere fibroblastic.

³Regiune din zigotul de amfibian, cu o pigmentare intermediară între emisfera animală foarte pigmentată și cea vegetativă, nepigmentată.

în contact cu țesut din emisfera vegetativă și este examinată după trei zile se constată apariția mezodermului, care poate fi identificat histologic prin prezența mușchilor, notocordului, sângelui și a mezenchimului sau imunocitochimic folosind anticorpi față de proteine produse de celulele mezodermale, ca actina musculară.

Protocol experimental

1. Se îndepărtează învelișul gelatinos din jurul embrionilor timpurii (după protocolul experimental prezentat în capitolul 1, subcapitolul *Xenopus laevis*, secțiunea IV) și se plasează în plăci cu agaroză, ce conțin 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice, după care se îndepărtează anvelopa vitelină (după protocolul experimental prezentat în capitolul 3, secțiunea IIA).
2. Cu un ac cu fir de păr poziționat la 30° de polul animal (Fig.115A) și o pereche de pense, se disecă regiunea calotei animale pigmentate. Calota animală poate fi secționată cu un ac cu fir de păr⁴ fie prin presarea laterală a regiunii animale a unui embrion așezat pe o parte (Fig.115B) sau prin tăierea printr-o incizie paralelă cu axa animal-vegetativă. Nu se recoltează calote prea mari, deoarece se pot lua și celule mezodermale din zona marginală.

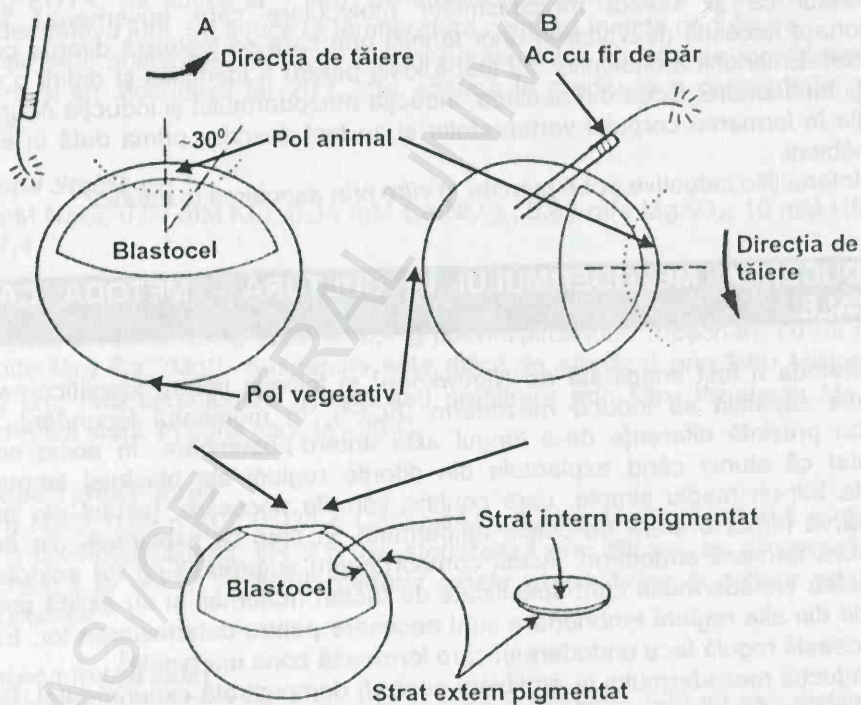


Fig.115. Metoda de izolare a calotei animale din blastula de amfibian.

⁴Se folosește un fir de păr din sprâncene, care se lipește cu parafină de o baghetă de sticlă.

3. Se spală ușor explantele din polul animal, prin pipetare. *Explantele nu trebuie să atingă suprafața lichidului, pentru că se sparg datorită tensiunii de suprafață.*
4. Se transferă explantele din calota animală într-un vas curat, tapetat cu agaroză, ce conține 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice.
5. Explantele se păstrează cu fața lor internă deasupra, separate unele de altele, deoarece au tendința de a fuziona.
6. Din acest punct se pot realiza două metode (1) incubarea explantelor din calota animală cu factori inductori de mezoderm și (2) realizarea de preparate "sandwich", animal-vegetative.

Incubarea explantelor din calota animală cu factori inductori de mezoderm

- Se incubează calotele animale cu factori de creștere de tipul FGF sau activin A la o concentrație de 0,1-200 ng/ml. Incubările se realizează în plăci de cultură cu 6-96 godeuri, tapetate cu agaroză.
- Explantele se vor răsuci cu stratul epidermal pigmentat la exterior. Doar stratul ectodermal intern răspunde la factorii inductori. După ce explantele se răsucesc pot fi transferate într-un vas curat cu 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice.
- Se cultivă explantele 3-6 ore, în 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice, pentru alungirea explantului și 1-3 zile pentru diferențierea țesuturilor (Fig.116A-D). Celulele din calota animală induse să devină mezoderm suferă deplasări ce mimează pe cele ale celulelor mezodermale în timpul gastrulării normale (extensia convergentă). Cronologia acestor mișcări morfogenetice nu este alterată *in vitro*, debutul mișcărilor celulelor induse într-un explant fiind un indiciu al tipului de mezoderm care se va forma. Identificarea celulelor mezodermale diferențiate se realizează după următoarele criterii: (1) apariția fibrelor musculare striate și a celulelor notocordale vacuolizate; (2) inducerea de tipuri celulare secundare, ca țesut nervos și melanocite; (3) identificarea prin hibridizare *in situ* a moleculelor specifice mezodermului (ARNm α -actină, specific musculară) sau imunocitochimie (Tabel 8) sau ambele.
- În paralel se cultivă câteva explante fără factori inductori. Acestea vor reprezenta martorul negativ pentru inducție și va evidenția acuratețea disecției.

Tabel 8. Anticorpii folosiți pentru identificarea țesuturilor induse

Anticorp	Țesut
Markeri activați	
Anticorp monoclonal 12/101	Recunoaște componentele intracelulare musculare
	Recunoaște matricea extracelulară a notocordului
Anticorp monoclonal MZ15	
Markeri inactivați	
Anticorp monoclonal Epi1	Epidermă
Anticorp antipectida 19/20	Epidermă (keratină)

Realizarea de preparate "sandwich" animal-vegetative

- Pentru a realiza agregate animal-vegetative se îndepărtează anvelopa vitelină a embrionilor în același stadiu cu cei de la care se prelevă calote animale (Protocol 1).
- Se disecă cu grijă o porțiune din polul vegetativ evitând regiunea ecuatorială. *Blastomerele vegetative mari sunt mult mai fragile ca blastomerele animale mici.* Se spală explantul vegetativ și se transferă într-un vas curat.

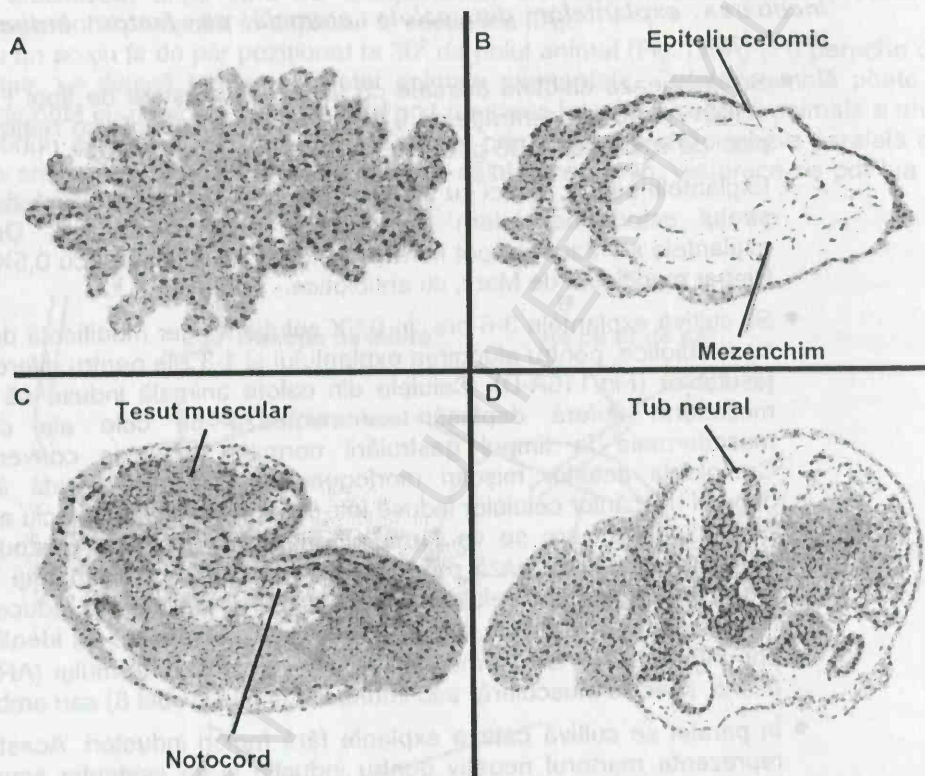


Fig.116. Inducerea mezodermului în calota animală. **A**-Calotă animală martor. **B**-Calotă animală în prezență de $1-10 \text{ ng ml}^{-1}$ FGF. **C**-Calotă animală în prezență de 50 ng ml^{-1} FGF. **D**-Calotă animală în prezență de activin.

- Se ia un explant animal și unul vegetativ și se așează unul peste celălalt, astfel încât suprafețele lor interne să se atingă cât mai mult posibil. Se lasă în repaus câteva secunde pentru aderare. Este convenabil să se plaseze explantul din calota animală cu fața externă pe agaroză și explantul din emisfera vegetativă deasupra. Se pot folosi și două explante animale între care este plasat un explant vegetativ.
- Se cultivă câteva explante singure. Acestea vor reprezenta controlul negativ pentru inducție.

- Se cultivă explantele 3-6 ore în 0,5X soluție Ringer modificată de Marc, cu antibiotice pentru alungirea explantului și 1-3 zile pentru diferențierea țesuturilor.

II. INDUCȚIA MEMBRELOR LA PĂSĂRI

Operațiile pe mugurii membrilor se realizează mai frecvent la mugurele aripii drepte, care este la suprafață. Mugurele aripii stângi reprezintă martorul. Se pot realiza operații și pe mugurele piciorului drept însă acesta este în apropierea alantoidei și operația este mai riscantă. Pentru aceste operații se folosesc instrumente speciale de tipul acelor mici cu fir de tungsten de 300 μm diametrul și spatule miniaturale. Operațiile pe mugurii membrilor pot fi realizate printr-o fereastră făcută în coaja oului. Fereastra se realizează de obicei la 2-3 zile după începutul incubării. Mugurii membrilor încep să se dezvolte la 21/22 zile de incubare.

Instrumentele se sterilizează prin spălare cu alcool etilic 70%, după fiecare operație.

Protocol experimental

Se accesează embrionul după protocolul prezentat în capitolul 1, subcapitolul *Gallus domestica*, secțiunea IIA.

Embrionul gazdă

1. Înaintea oricărei operații se îndepărtează cu pensele cele două membrane situate deasupra embrionului (membrana vitelină și amniosul).
2. După îndepărtarea învelișurilor extraembrionare se introduce o microspatulă sub mugurele aripii și se taie cu ace fin un fragment de țesut, din marginea anterioară a mugurelui (Fig. 117). Bucata de țesut tăiată este îndepărtată cu microspatula.

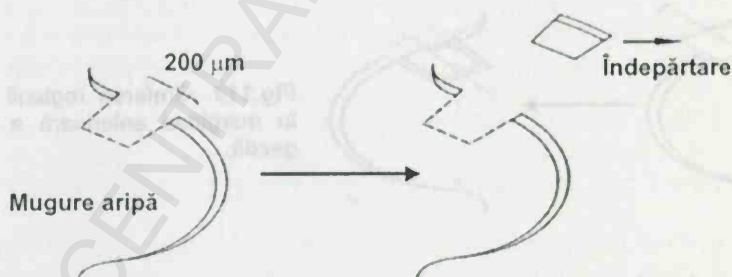


Fig.117. Îndepărtarea unui fragment din marginea anterioară a unui mugure membranar gazdă.

Pregătirea grefei

1. Se scoate embrionul din ou și se plasează într-un vas Petri ce conține mediu de cultură sau tampon fosfat salin (echilibrat cu aer).
2. Se secționează mugurii membrilor cu un foarfece fin. Identificarea marginii posterioare este posibilă după forma mugurelui.
3. Se secționează regiunea polarizată din marginea posterioară a mugurelui. Un ac este folosit pentru a înțepa mugurele iar altul pentru tăierea țesutului. Se realizează două tăieturi (Fig.118).

4. După secționare se inseră acul care va ține grefa după transplantare și servește în acest moment pentru a marca orientarea țesutului.

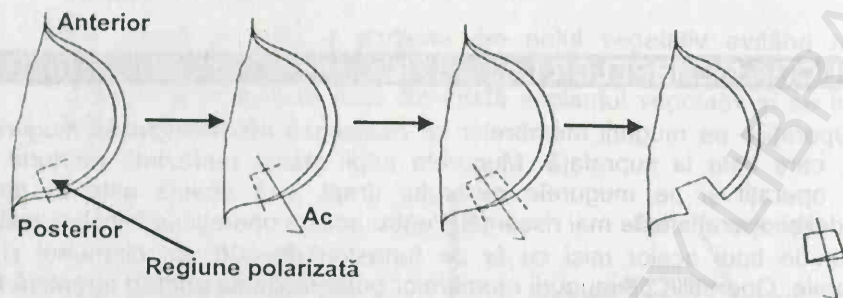


Fig.118. Schema izolării regiunii polarizate din marginea posterioară a mugurelui aripiei.

5. Se folosește acul pentru securizarea regiunii polarizate, înaintea realizării secționării finale. Capătul curbat marchează marginile țesutului acoperit de ectoderm.
6. Grefa reprezentată de regiunea polarizată poate fi transferată direct embrionului gazdă, cu acul sau pe microspatulă. Grefele de țesut care nu sunt compacte, ca de exemplu un sediment de celule pot fi transferate cu o pipetă Pasteur.
7. Este bine să se transfere regiunea polarizată la un loc sigur în embrionul gazdă, de exemplu, pe corp, lângă mugurele aripiei, după care se introduce în mugure (Fig.119). Se presează acul în țesutul gazdă. Acul va fi îndepărtat în dimineața următoare.

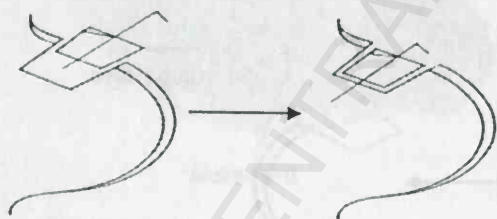


Fig.119. Grefarea regiunii polarizate în marginea anterioară a mugurelui gazdă.

8. Se sigilează oul cu embrionul operat cu bandă adezivă. Efectele pot fi observate după minimum 4-5 zile.
9. La intervalul dorit se desface oul și aripile operate sunt colectate, fixate și colorate cu Albastru alcian pentru a identifica elementele cartilaginease.

Colorarea cu Albastru alcian

- Pentru scoaterea embrionului din ou se lărgiște fereastra cu un foarfece și se îndepărtează membranele extraembrionare, care s-au refăcut deasupra embrionului, până ce capul devine vizibil. Se trece o spatulă mică după gât și se scoate cu grijă embrionul din ou.

- Se plasează embrionul într-un vas ce conține soluție salină și se secționează gâtul cu foarfecele.
- Se transferă corpul în alt vas ce conține 5% acid tricloracetic (TCA) și se secționează cu un foarfece aripile, la nivelul peretelui corpului.
- Se fixează aripile 3 ore, în 5% TCA.
- Spălare în apă și plasare în 0,1% Albastru alcian în alcool acid cel puțin 3 ore (sau peste noapte).
- Diferențiere în alcool acid peste noapte.
- Deshidratare prin trei băi de alcool etilic absolut, o oră fiecare baie și clarificare în salicilat de metil (Fig.120).

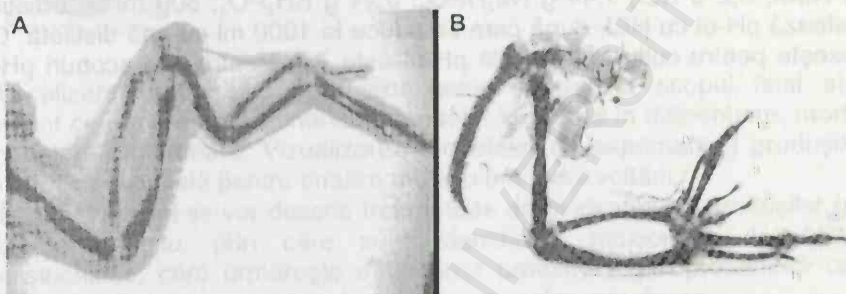


Fig.120.A- aripă normală. B-Duplicarea degetelor prin grefarea zonei de activitate polarizată în mezodermul anterior.

III. MEDII ȘI SOLUȚII

■ *Alcool acid*

1 % HCl în 70% etanol

■ *Soluție Ringer modificată de Marc*

Soluție stoc 10X: Se amestecă 58,4 g NaCl și 12 g HEPES. Se adaugă apă până la 700 ml și se ajustează pH-ul la 7,6. Se adaugă 1,5 g KCl; 2,4 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,4 g EDTA. Se aduce la 1 litru. Se sterilizează prin filtrare și se stochează la frigider câteva luni. Se aduce la temperatura camerei înainte de folosire.

Soluție stoc antibiotice 200X: 10 mg/ml gentamicină. Soluția se sterilizează prin filtrare și se stochează la -20°C . Se adaugă în mediu la o concentrație de 50 $\mu\text{g/ml}$.

■ *Tampon fosfat salin*

8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na_2HPO_4 ; 0,24 g KH_2PO_4 ; 500 ml apă distilată. Se ajustează pH-ul cu HCl, după care se aduce la 1000 ml cu apă distilată. Când se folosește pentru cultura de celule pH-ul este 7,2. Pentru alte scopuri pH-ul este 7,4.

CAPITOLUL

5

METODE DE EVIDENȚIERE A PRODUȘILOR GENICI

Localizarea precisă a produșilor genici reprezintă scopul final al oricărui experiment ce urmărește descrierea proceselor implicate în diferențiere, morfogeneză sau modelare embrionară. Vizualizarea modelelor de exprimare a produșilor genici este o tehnică esențială pentru analiza moleculară a dezvoltării.

În acest capitol se vor descrie trei metode de evidențiere a produșilor genici: (1) hibridizarea *in situ*, prin care sunt identificate moleculele de ARNm¹; (2) imunohistochimia, care urmărește detectarea proteinelor/glicoproteinelor celulare și extracelulare; (3) detectarea histochimică a proteinelor raportoare.

I. HIBRIDIZAREA *IN SITU*

Metoda de hibridizare *in situ* a fost realizată prima dată în 1984, de către colectivul condus de Robert Angerer, pe secțiuni din embrioni de ascidian. Ulterior a fost îmbunătățită de câteva grupuri, în special cel al lui McMahon și Wilkinson.

Informațiile obținute prin hibridizare *in situ* oferă descrieri spațiale și temporale ale transcrierii genelor. Cu toate acestea, metoda nu oferă informații despre traducerea ARNm sau despre localizarea ulterioară, modificarea sau stabilitatea proteinei. În tabelul 9 sunt prezentate câteva din posibilitățile și dificultățile hibridizării *in situ*.

Hibridizarea *in situ* reprezintă o metodă de detectare a unui ADN sau ARN într-o secțiune de țesut sau într-un embrion întreg, folosind o probă de acid nucleic marcat, numită sondă.

În tabelul 10 sunt prezentate avantajele și dezavantajele sondelor ADN și ARN pentru hibridizarea *in situ*.

Metodele de detectare a unei molecule de ARN implică următoarele etape: (1) sinteza unei sonde ARN/ADN marcate; (2) fixarea și permeabilizarea țesutului/embrionului; (3) hibridizarea sondei; (4) îndepărtarea sondei nehibridizate prin spălare; (5) vizualizarea hibridizării.

¹Se vor face referiri numai la metoda de hibridizare *in situ* prin care se pun în evidență ARNm pe secțiuni sau embrioni întregi. Tehnica de hibridizare *in situ* pe cromozomi nu face obiectul acestei cărți.

Tabel 9. Aspecte comparative ale hibridizării *in situ*

Gene	Strategia	Efecte posibile	Dificultăți majore
Gene structurale (de ex., actină, collagen)	Se folosesc țesuturi și embrioni în anumite stadii de dezvoltare	Moleculele transcript pot să nu fie localizate într-un anumit țesut în toate stadiile de dezvoltare	Multe gene structurale fac parte din familii multigenice; chiar dacă familia nu a fost identificată, o secvență din probă poate codifica motive prezente și în alte proteine, aspect care determină reactivitate încrucișată
Gene reglatoare (gene homeobox, gene care codifică factori transcripționali)	Se folosesc țesuturi și embrioni în anumite stadii de dezvoltare. Deoarece distribuția în țesut este de obicei mai puțin clară la începutul studiului, se examinează un număr mare de secțiuni	Moleculele transcript pot fi dispuse în gradient sau supra-puse, ceea ce necesită realizarea de secțiuni în diferite planuri; genele homeobox prezintă adesea un gradient rostral-caudal, care poate fi vizionat ușor în plan sagital	Ca și în cazul genelor structurale, genele care codifică factori transcripționali fac parte din familii înrudite.
Gene care codifică receptori și liganzi	Sunt necesare studii pentru identificarea atât a receptorului cât și a ligandului; în acest caz anticorpii sunt singura cale de a determina localizarea liganzilor	Analizele pot conduce la elucidarea rolului receptorilor și liganzilor	Aceleași ca mai sus

(După Sassoon și Rosenthal, 1993)

Tabel 10. Avantajele și dezavantajele sondelor pentru hibridizare *in situ*

Probe	Avantaje	Dezavantaje
ARN	<ul style="list-style-type: none"> • Activitate specifică mare • Hibrizii ARN sunt foarte stabili • Tratamentul după hibridizare cu RNază îndepărtează majoritatea sondei nelegate specific • Foarte sensibilă 	<ul style="list-style-type: none"> • ADN trebuie subclonat într-un vector de transcripție • Unele sonde ARNc creează o colorare nespecifică intensă, relativ stabilă • ARNc este degradat mai ușor decât probele ADN
ADN	<ul style="list-style-type: none"> • Nu sunt necesare subclonări suplimentare • Colorarea nespecifică este adesea mai scăzută decât în cazul ribosondelor • ADN este mult mai rezistent la degradare decât ARNc 	<ul style="list-style-type: none"> • Catenele probei se pot reasocia în cursul hibridizării, reducând semnalul de hibridizare • Hibrizii ADN-ARN sunt mai puțin stabili decât cei ARN-ARN • Nu sunt așa de sensibile ca ribosondele

A. Sonde de hibridizare

Sunt reprezentate de fragmente de ADN sau ARN modificate sau sintetizate într-o manieră enzimatică, în prezența unor precursori nucleotidici trifosfat marcați. Acești precursori pot fi marcați radioactiv sau neradioactiv. Sondele radiomarcate sunt folosite mai frecvent pe secțiuni, în timp ce cele neradioactive în hibridizarea *in situ* pe embrioni întregi. Deși în ultimul timp au fost înlocuite de sondele neradioactive, sondele radioactive reprezintă singura metodă de detectare a moleculelor transcris în cantități mici (Mahmood și Mason, 1999).

Sondele radioactive utilizate pentru hibridizarea *in situ* sunt marcate cu ^{32}P , ^{35}S sau ^3H . Alegerea izotopului depinde de tipurile de țesut sau embrioni.

În tabelul 11 sunt prezentate comparativ cele mai importante proprietățile ale celor trei izotopi folosiți.

Tabel 11. Compararea celor trei izotopi folosiți în hibridizarea *in situ*

Proprietăți	^3H	^{35}S	^{32}P
Activitatea specifică maximă (d.p.m./μg)	2×10^8	2×10^9	$>5 \times 10^9$
Eficiența autoradiografică relativă (Kodak NTB-2)	1	5	1
Timpul de înjumătățire	12,4 ani	87,4 zile	14,3 zile
Rezoluția	cea mai bună	bună	scăzută
Numărul de granule autoradiografice/kilobaze probă hibridizată/zi	0,003	0,15	0,07-0,15

(După Angerer și Angerer, 1992)

Activitatea specifică a precursorilor radioactivi se exprimă în Curie/milimol (Ci/mmol) sau în Becquerel/milimol (Bq/mmol). Un Curie reprezintă o unitate de radioactivitate ce corespunde la $2,22 \times 10^{12}$ dezintegrări/minut, în timp ce un Becquerel reprezintă dezintegrarea/secundă.

Nucleotide trifosfat marcate cu ^{32}P

Fosforul 32 emite radiații β^- (electroni) cu o energie de emisie de 1,71 megaelectroni volți (MeV). Sondele marcate cu acest element au o sensibilitate de detectare mare, dar o rezoluție autoradiografică mediocră la nivelul compartimentelor celulare. Durata de viață a izotopului este de 14,3 zile iar activitatea specifică disponibilă comercial este de 3000 Ci/mol.

Atomii de fosfor ai nucleotidelor trifosfat sunt desemnați α , β și γ . Nucleotidele marcate în poziția α sunt folosite pentru sinteza *in vitro* de ADN sau ARN radioactiv, deoarece este gruparea fosfat ce permite stabilirea unei legături fosfodiester în cursul polimerizării. Aceste sonde au stabilitate limitată, deoarece emiterea particulei electronice β^- transferă atomul de fosfor la un atom de sulf (cu același număr de masă), conform reacției: $^{32}\text{P}_{15} \rightarrow ^{32}\text{S}_{16} + e^-$. În consecință, are loc ruperea legăturii covalente dintre cele două nucleotide și radioliza rapidă a sondei.

Probele marcate cu ^{32}P nu sunt utile pentru detectarea ARNm la rezoluție mare, prin autoradiografie. Acest izotop este ales doar în cazul în care este necesară o rezoluție macroscopică, semnalul de hibridizare fiind detectat cu film de raze X.

Nucleotide trifosfat marcate cu ^{35}S

Sulfurul 35 emite de asemenea radiații β^- , cu o energie de emisie de 0,167 MeV, de două ori mai stabilă decât a ^{32}P . În consecință, sensibilitatea de detecție este mai mare și rezoluția autoradiografică mai bună decât a ^{32}P . Timpul de înjumătățire este

de 87,4 zile și din acest motiv sondele marcate cu sulf radioactiv sunt mai stabile decât cele marcate cu fosfor radioactiv.

În precursorii marcați cu ^{35}S , atomul radioactiv se substituie unui atom de oxigen din gruparea fosfat aflată în poziția α (Fig.121). În momentul dezintegrării, sulful radioactiv este transferat la clor determinând ruperea legăturii fosfodiester. Activitățile specifice ale ribo și deoxiribonucleotidelor marcate cu sulf radioactiv sunt de 40-1000 Ci/mmol. ^{35}S are o sensibilitate de 50 de ori mai mare decât ^3H , datorită activității specifice mai mari a ribonucleotidelor și a eficienței autoradiografice (granule/dezintegrare), care este de cinci ori mai mare.

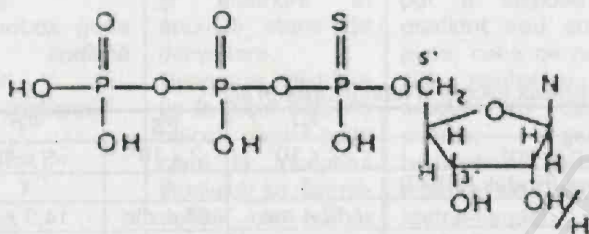


Fig.121. Ribo/deoxiribonucleotidă trifosfat marcată cu sulf radioactiv.

Sondele marcate cu ^{35}S nu sunt recomandate pentru hibridizarea *in situ* în țesuturile adulte, bogate în proteine, de tipul pancreasului, deoarece determină o colorare nespecifică foarte intensă.

Este cea mai folosită ribosondă pe secțiuni de țesut, datorită sensibilității mari și semnalului obținut, care are rezoluție bună (aproximativ un diametru celular).

Nucleotide trifosfat marcate cu ^3H

Tritiul este un emițător de radiații β^- , foarte stabil (timpul său de înjumătățire este de 12,4 ani), cu o energie de 0,019-MeV. Tritiul poate substitui unul (de exemplu, 5- ^3H UTP²) sau mai mulți atomi de hidrogen (1 : 2 : 2 : 8 - ^3H -dATP) din bazele azotate sau zahar, ceea ce permite obținerea unei game de activități specifice de 30-100 Ci/mmol.

Sondele neradioactive sunt marcate cu biotină, digoxigenină (Fig.122) sau fluorocromi.

Precursorii sondelor neradioactive sunt reprezentați de nucleotide trifosfat, în care baza azotată este cuplată cu o moleculă organică, evidențiată după hibridizare.

Avantajele sondelor neradioactive: (1) sunt mai sigure; (2) detectarea histochimică furnizează o rezoluție mai mare decât autoradiografia; (3) dezvoltarea reacției histochimice poate fi monitorizată și controlată fără pierderea materialului; (4) tehnica este mai rapidă; (5) probele neradioactive sunt stabile nedefinit, în timp ce radioprobele sunt limitate de timpul de înjumătățire al izotopului încorporat; (6) sensibilitatea sondelor neradioactive este de 2-5 ori mai mare decât cea a celor marcate cu fosfor radioactiv; (7) nu necesită echipamente și aprobări speciale iar rezultatele pot fi evidențiate imediat după hibridizare.

Sonde biotinilate

Nucleotidele biotinilate există sub formă de dUTP-7-biotină, dUTP-11-biotină, UTP-14-biotină, etc. (cifrele desemnând numărul de atomi de carbon și azot, care separă baza azotată de biotină). Biotina este legată la carbonul din poziția 5 a unei baze pirimidinice (Fig.122).

²Uridine triphosphate

Se pun în evidență după hibridizare, prin intermediul avidinei/streptavidinei cuplate cu o moleculă semnal (peroxidază, fosfatază alcalină, aur coloidal).

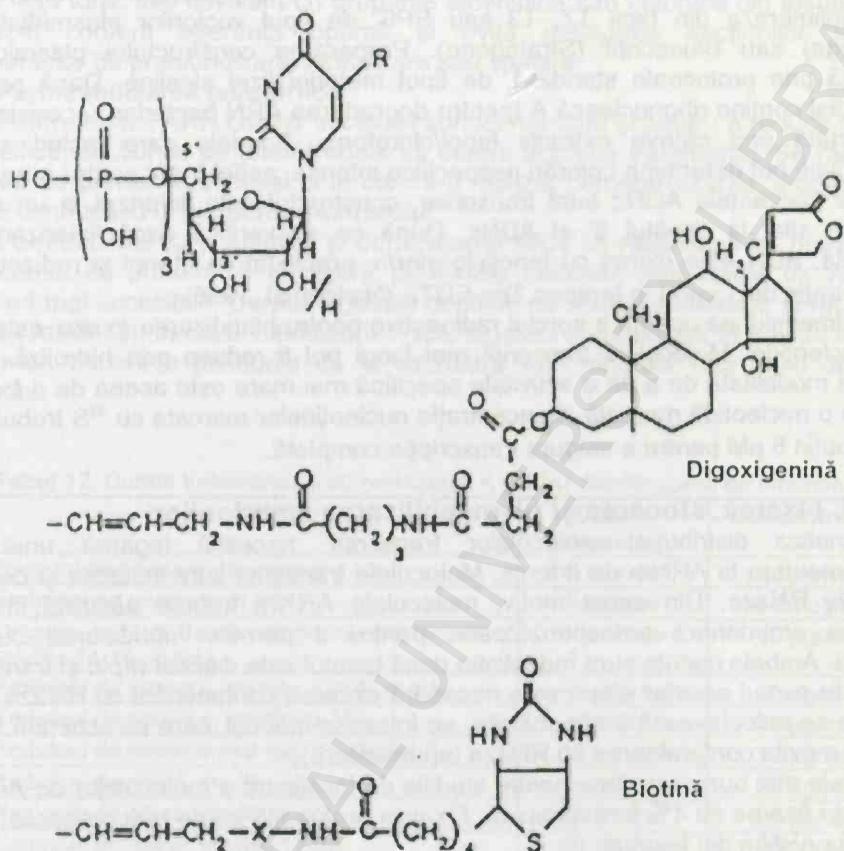


Fig.122. Uridină/deoxiuridină trifosfat marcată neradioactiv. R=digoxigenină sau biotină. X-lanț de 5-18 atomi.

Sonde marcate cu digoxigenină

Digoxigenina este un steroid extras din digitală, fiind deci o moleculă de origine vegetală. Fixarea sa pe (deoxi)uridină se realizează într-o manieră asemănătoare cu cea a biotinei (Fig.122). Este pusă în evidență după hibridizare cu un anticorp anti-digoxigenină, conjugat cu fosfatază alcalină, peroxidază sau fluorocromi. Aceste sonde dau rezultate foarte bune mai ales în țesutul nervos.

Sonde marcate cu fluorocromi sunt realizate prin atașarea covalentă a fluorocromilor la nucleotide. Sunt reprezentate în general de fluoresceină-12-UTP. Aceste ribosonde dau un semnal slab și sunt folosite pentru detectarea moleculelor transcript în cantități mari.

Sinteza sondelor marcate se realizează prin polymerizarea precursorilor ribo sau deoxiribonucleotidici trifosfat (NTP și dNTP, unde N reprezintă baza azotată).

ADN este marcat prin "random priming", "nick-translation" sau PCR. Spre deosebire de ADN, probele ARN sunt generate prin transcripție *in vitro* dintr-o matrită liniarizată.

Fragmentul de ARN complementar cu molecula transcript este generat prin clonarea secvențelor de ADNc într-un vector, ce conține situsuri de inițiere pentru ARN polimeraza din fagii T7, T3 sau SP6, de tipul vectorilor plasmidiali pGEM (Promega) sau Bluescript (Stratagene). Prepararea constructului plasmidic este realizată prin protocoale standard, de tipul metodei lizei alcaline. Dacă preparatul plasmidial conține ribonuclează A (pentru degradarea ARN bacterian) aceasta trebuie îndepărtată prin câteva extracții fenol/cloroform. Sondele care includ secvențe plasmidiale pot determina colorări nespecifice intense, astfel încât pentru a ne asigura că doar secvențele ADNc sunt transcrise, constructul este liniarizat la un situs de restricție aflat la capătul 5' al ADNc. După ce se verifică dacă liniarizarea este completă, ADN este extras cu fenol/cloroform, precipitat cu etanol și redizolvat la o concentrație de 1 µg/µl în tampon Tris-EDTA (Nieto și al., 1996).

Dimensiunea optimă a sondei radioactive pentru hibridizarea *in situ* este de 50-200 nucleotide. Moleculele transcript mai lungi pot fi reduse prin hidroliză limitată. Singura modalitate de a da o activitate specifică mai mare este aceea de a folosi mai mult de o nucleotidă marcată. Concentrația nucleotidelor marcate cu ³⁵S trebuie să fie de cel puțin 5 µM pentru a asigura transcripția completă.

B. Fixarea, stocarea și permeabilizarea embrionilor

Analiza distribuției moleculelor transcript, necesită legarea unei probe complementare la ARNm de interes. Moleculele transcript sunt instabile și degradate rapid de RNaze. Din acest motiv, moleculele ARNm trebuie păstrate intacte în regiunea embrionară corespunzătoare, pentru a permite hibridizarea cu proba marcată. Ambele cerințe sunt îndeplinite dacă țesutul este disecat rapid și transferat în fixator. În cursul acestor etape este necesară evitarea contaminării cu RNază. Pentru aceasta se autoclavează toate soluțiile, se folosesc mănuși, care se schimbă frecvent (pentru a evita contaminarea cu RNaza tegumentară).

Cele mai bune rezultate pentru studiile de localizare a moleculelor de ARNm se obțin prin fixarea cu 4% formaldehidă. Fixarea prelungită poate reduce accesibilitatea sondei la ARNm din țesuturi.

În cazul hibridizării *in situ* pe embrioni întregi, sondele de hibridizare pot fi captate în cavități, determinând colorări nespecifice intense. Din acest motiv, la mamifere este necesară disecția (membrana Reichert) sau punșionarea membranelor extraembrionare (amniosul). În embrionii mai avansați de 9 zile, pentru rezultate optime, se punșionează cavitățile de tipul ventriculilor cerebrali și a camerelor inimii (Rosen și Beddington, 1993).

După fixare, în multe cazuri este necesară stocarea pe termen lung. Pentru embrionii întregi se folosește deshidratarea în serii gradate de metanol/etanol, la -20°C. Probele pot fi stocate până la un an.

Probele analizate pe secțiuni pot fi congelate și secționate la criostat sau incluse în parafină și secționate la microtom. Secțiunile la criostat reprezintă o metodă rapidă pentru procesarea țesuturilor, cu avantajul că permite detectarea ARNm în secțiuni seriate. Principalul dezavantaj constă în păstrarea redusă a morfologiei și dificultatea de a obține secțiuni seriate din embrioni. Secționarea la criostat este precedată de congelarea probei în azot lichid, ceea ce determină ruperea embrionilor, în special cei în stadiile timpurii. Pentru împiedicarea ruperii, embrionii se trec prin soluții crescătoare de zaharoză.

Pentru evitarea contaminării cu RNază, lamele pe care se întind secțiunile se acoperă cu aminoalchilsilan. 3-aminopropiltrietoxisilan interacționează cu siliciul din sticlă, pentru a produce grupări aminoalchil pe suprafața sticlei. Grupările aminoalchil se pot lega ionic sau covalent cu grupările aldehidice sau cetone din țesuturi. Acest tratament conferă aderență optimă și evită detașarea secțiunilor în cursul tratamentelor de prehibridizare, hibridizare sau spălare.

Permeabilizarea țesuturilor

Pentru a face ARN celular accesibil sondei marcate și pentru a reduce colorarea nespecifică, secțiunile de țesut trebuie să sufere anumite tratamente. Se recomandă folosirea secțiunilor în aceeași zi în care s-a realizat permeabilizarea, stocarea peste noapte conducând la pierderea semnalului.

Permeabilizarea țesuturilor și demascarea ARN se realizează cu proteinază K. Tratamentul cu proteinază K digeră proteinele celulare, moleculele de ARN ținând devenind mai accesibile. Durata digestiei depinde de stadiul embrionar și regiunile de interes (Tabel 12). În cazul hibridizării *in toto* digestia se realizează în funcție de stadiul embrionar, deoarece țesuturile de la suprafață sunt digerate mai rapid decât cele profunde.

Tabel 12. Durata tratamentului cu proteinază K pentru diferite specii de embrioni

Proba	Durata digestiei	Concentrația
Secțiuni embrionare de șoarece	5 minute	20 μg/ml
Embrioni de șoarece, <i>in toto</i>	5 minute	10-20 μg/ml
Organe izolate de la embrioni de șoarece stadiile 14-16, <i>in toto</i>	60 minute	10 μg/ml
Embrioni de șoarece, stadiile 12/14, <i>in toto</i>	40 minute	10 μg/ml
Embrioni de șoarece, stadiile 9-10	20 minute	10 μg/ml
Embrioni de șoarece mai mici de stadiul 9	10 minute	10 μg/ml
Embrioni de găină, stadiile 3-6	5 minute	20 μg/ml
Embrioni de găină, stadiile 6-12	10 minute	20 μg/ml
Embrioni de găină, stadiile 12-25	20 minute	20 μg/ml
Embrioni <i>Xenopus laevis</i>	5-20 minute	10 μg/ml
Embrioni timpurii de <i>Danio rerio</i>	1 minut	10 μg/ml
Embrioni de <i>Danio rerio</i> din stadiul de 30% epibolie până în stadiul de 10 somite	2-3 minute	10 μg/ml
Embrioni de <i>Danio rerio</i> , 10-20 somite	3-4 minute	10 μg/ml
Embrioni de <i>Danio rerio</i> , 24-32 somite	5-6 minute	10 μg/ml
Embrioni de <i>Danio rerio</i> , 40-50 somite	10-15 minute	10 μg/ml
Embrioni <i>Drosophila</i> , <i>in toto</i>	2-4 minute	50 μg/ml

Pentru ca țesuturile să nu se dezintegreze în etapele ulterioare, după digestie este necesară includerea unei etape de post-fixare. În cazul hibridizării cu probe marcate cu ³⁵S este necesar să se lucreze în condiții reducătoare. În acest scop se realizează un tratament cu dithiothreitol.

Se pot realiza și tratamente cu anhidridă acetică, pentru reducerea legării electrostatice a sondelor, la țesuturi ce conțin grupări amino acetilate, încărcate pozitiv. Anhidrida acetică servește la inactivarea proteazei și participă la

transformarea grupării amino $-NH_3^+$ din proteine, în gruparea amido $-NH-CO-CH_3$ (neutră). Această reacție este eficientă pentru diminuarea colorării nespecifice.

C. Hibridizarea

Reușita hibridizării depinde de temperatură, un parametru important fiind temperatura de fuziune T_m . T_m reprezintă temperatura la care 50% din acidul nucleic este sub formă dublu catenară. T_m este influențată de următorii factori: (1) temperatura, viteza de renaturare are loc între $16^\circ - 32^\circ C$ sub T_m ; (2) T_m depinde de pH într-o gamă largă, ce variază între 5 și 9; (3) cationii monovalenți (de exemplu, Na^+) interacționează electrostatic cu acizii nucleici (în special cu grupările fosfat), astfel încât tăria ionică a concentrațiilor saline ridicate cresc stabilitatea hibridului și astfel cresc T_m ; (4) formamida reduce stabilitatea termică a acizilor nucleici dublu catenari și din acest motiv, hibridizarea poate avea loc la o temperatură mai scăzută; (5) procentul de GC³ (fiecare 1% din conținutul G/C crește temperatura de topire cu aproximativ $0,41^\circ C$); (6) stabilitatea termică a duplexurilor este legată de lungimea probei, fragmentele lungi fiind mult mai stabile decât cele scurte; (7) asocierea greșită a bazelor perechi (procentul de similitudine) descrește T_m cu $1^\circ C$ pentru fiecare procent de împerechere greșit.

Pentru hibridii ARN-ARN, estimarea finală a T_m poate fi calculată după următoarea formulă: $T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\%G+C) - 0,35 (\% \text{ formamidă}) - (500/n) - \% \text{ împerechere greșită}$, unde M = concentrația molară a ionilor monovalenți; n = lungimea fragmentelor de probă marcată. Pentru $M = 0,39 M Na^+$; $G + C = 40\%$; procentul de formamidă = 50; $n = 125$ baze. Folosind probe omoloage, valoarea T_m pentru hibridii ARN-ARN este de $70^\circ C$ (Franco și al., 2001).

La o concentrație de 4×10^4 cpm/μl amestec de hibridizare există un semnal bun pentru majoritatea probelor. Pentru molecule de ARNm abundente, sondele pot fi folosite pentru o perioadă de trei luni. Pentru a obține cel mai intens semnal posibil, în special cu sondele dublu marcate, pentru a detecta ARNm mai puțin abundente, hibridizarea se realizează cât de curând posibil după marcarea cu un lot nou de nucleotide. Expunerea mai lungă este mai bună decât folosirea unei probe concentrate.

Eficiența hibridizării acizilor nucleici descrește în următoarea ordine ARN-ARN, ADN-ARN, ADN-ADN.

D. Tratamente post-hibridizare

După hibridizare, pentru îndepărtarea sondei nehibridizate se realizează spălări și incubări cu RNază. Trebuie acordată o atenție deosebită acestui tratament, deoarece RNaza este o enzimă extrem de stabilă și dificil de inactivat.

E. Detectarea hibridizării

Hibridii radioactivi sunt detectați prin autoradiografie, pe baza capacității lor de a forma o imagine într-o emulsie fotografică. Probele marcate cu ^{35}S permit localizarea hibridului la nivel celular într-o săptămână.

Semnalul depinde de temperatură și durata dezvoltării. Temperatura este păstrată la $18^\circ C$ pentru a evita umflarea emulsiei și a permite soluției de dezvoltare să penetreze adânc emulsia. Timpul de dezvoltare standard este de 4 minute, însă sunt posibile dezvoltări de până la 16 minute. La incubări mai lungi, semnalul poate

³Guanină Citozină

crește de 15 ori (dar și colorarea nespecifică), granulele de argint sunt mai mari, însă rezoluția este mai scăzută.

Autoradiografia este o metodă de localizare a unei probe radiomarcate într-un țesut. Radioizotopii au fost descoperiți pe baza capacității lor de a înnegri hârtia fotografică. Emulsia fotografică conține gelatină, în care sunt incluse cristale de halogenură de argint, de obicei bromură de argint. Sensibilitatea unei emulsii depinde de dimensiunea și concentrația acestor cristale. O emulsie este cu atât mai sensibilă cu cât are cristale mai mari și mai numeroase. Rezoluția unei imagini depinde de lungimea căii emisiei radioactive. Aceasta este influențată de energia, tipul de emisie și dimensiunea cristalelor de halogenură de argint din emulsie. Cu cât granulația este mai mică, cu atât rezoluția este mai mare. Pentru a maximaliza sensibilitatea, concentrația de halogenură de argint este mare. Izotopii care emit energie scăzută, ca ^3H dau o rezoluție excelentă. Din contră, cei cu energie de emisie mare au o rezoluție slabă.

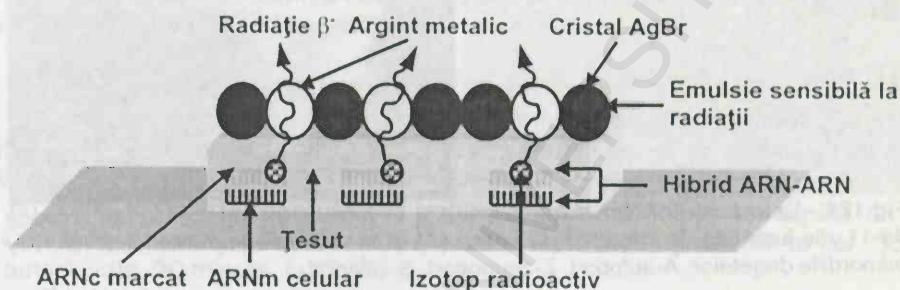


Fig.123. Reprezentarea schematică a autoradiografiei.

Când o particulă β^- trece prin emulsia fotografică, energia este pierdută într-o serie de interacții cu electronii orbitali ai cristalului de halogenură de argint, ceea ce determină formarea de argint metallic (Fig.123). Ca rezultat, înnegrirea unui film în acest tip de autoradiografie (directă) este direct proporțională cu cantitatea de radiație. Soluția de dezvoltare conține o substanță revelatoare (de exemplu, amidol), care are rolul de a reduce sarea de argint din emulsie, o substanță de conservare, cu rolul de a împiedica oxidarea revelatorului sub influența oxigenului atmosferic (metabisulfid de sodiu) și o substanță care împiedică reducerea sării de argint neimpresionate de lumină (bromură de potasiu). Solventul în care se dizolvă toate componentele este apa bidistilată. În cursul procesului de dezvoltare, agenții reducători prezenți în soluția de dezvoltare (de exemplu, amidol) determină reducerea cristalelor de halogenură de argint în argint metallic, printr-un proces autocatalitic, de amplificare. Odată ce ioni de argint din cristal sunt transformați în argint metallic, dezvoltarea se oprește.

După dezvoltare, secțiunile se fixează. În general, în emulsie rămâne o cantitate apreciabilă de halogenură de argint neimpresionată, care dacă nu este îndepărtată se va reduce treptat sub influența luminii și va determina colorări nespecifice. Fixarea are loc în două etape. În prima etapă, halogenura de argint neredusă formează în prezența tiosulfatului de sodiu o sare de argint greu solubilă. În a doua etapă, sarea de argint greu solubilă în prezența tiosulfatului de sodiu este convertită într-o sare de argint ușor solubilă. În cursul acestui tratament se dizolvă halogenura de argint nemetalică, fără afectarea argintului metallic. După fixare, filmul

trebuie spălat abundant cu apă. Spălarea este importantă deoarece stabilizează imaginea fotografică și are rolul de a îndepărta complet tiosulfatul de sodiu și sarea de argint ușor solubilă sau alte substanțe din emulsie (Harvey, 1998).

Detectarea moleculelor de ARNm abundente, cu sonde marcate cu ^3H de 1×10^8 d.p.m./ μg necesită o expunere de 3 zile-o săptămână; detectarea unui ARNm mai rar, cu sonde marcate cu ^{35}S de 5×10^8 d.p.m./ μg necesită 2-4 săptămâni. Rezultatele hibridizării pot fi observate în microscopia optică, unde apar sub forma unor precipitate de culoare neagră (Fig.124A) sau în microscopia cu câmp întunecat în care precipitatele apar galben aurii, luminoase, pe fond negru (Fig.124B).

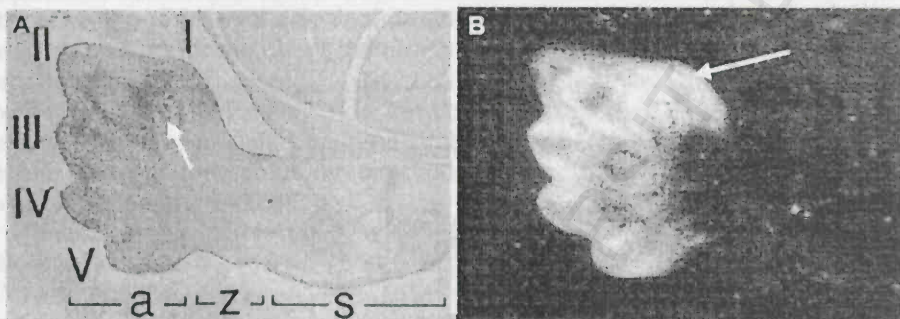


Fig.124. Detectarea ARNm *Hoxd-13* (săgeți) în membrele embrionului de șoarece de 11 zile jumătate, în microscopia optică (A) și în cea cu câmp întunecat (B). I-IV primordiile degetelor. A-autopod. Z-zeugopod. S-stilopod.

Hibrizii neradioactivi sunt detectați în funcție de markerul folosit. Biotina cu avidină/streptavidină marcată. Digoxigenina cu anticorpi anti-digoxigenină cuplată cu fosfatază alcalină (Fig.125). Țesuturile ce conțin hibrizi marcați cu fluorocromi sunt observate direct la microscopul de fluorescență.

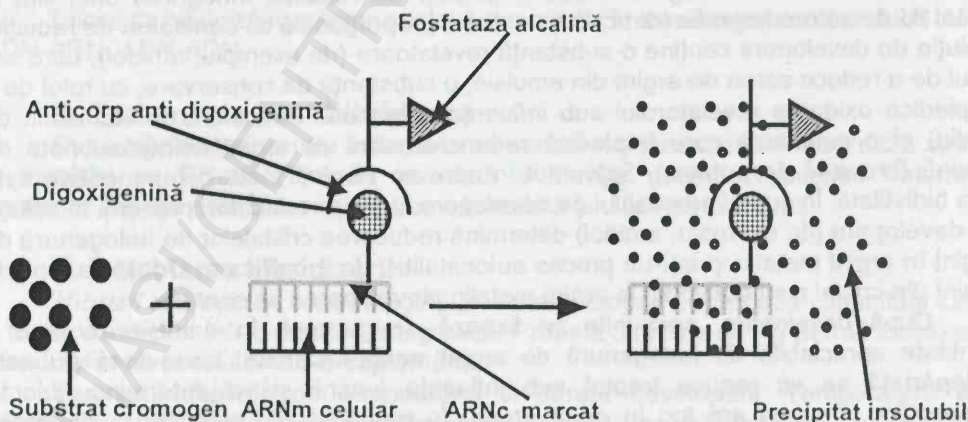


Fig.125. Schema hibridizării *in situ* folosind ribosonde marcate cu fosfatază alcalină.

F. Martorii hibridizării

Hibridizarea *in situ* este o tehnică în care se pot înregistra foarte multe artefacte. Din acest motiv, se folosesc mai multe tipuri de probe martor sau control. Există două tipuri de martori: (1) pozitivi; (2) negativi.

Martorii negativi nu trebuie să dea semnal de hibridizare și pot fi de mai multe tipuri.

- Controlul sondei: se verifică pe un țesut care nu conține ARN cu secvențe complementare cu ale sondei;
- Controlul materialului: Se verifică prin realizarea hibridizării cu o sondă heteroloagă (nu conține secvențe complementare);
- Hibridizare după tratamentul țesutului cu RNază;
- Hibridizare în prezența probei antisens nemarcată, în exces.
- Hibridizare fără probă.
- Omiterea anticorpului față de biotină sau digoxigenină.

Martorii pozitivi au semnal de hibridizare și sunt reprezentați de țesuturi care exprimă în cantități mari ARNm țintă.

Protocol experimental

Succesul hibridizării *in situ* depinde foarte mult de evitarea contaminării probelor cu RNază. Toate materialele folosite, sticlăria, vârful pipetelor, lamele și soluțiile se sterilizează. "Materialele uscate" sunt sterilizate, 3 ore, la 140°C. "Materialul uscat" care nu poate fi sterilizat prin căldură trebuie șters cu o soluție proaspătă de 0,1% DEPC în 96% metanol, fără RNază (Molecular Bioproducts) și uscate la aer. Soluțiile sunt autoclavate, 30 minute, la 120°C.

1. Transcrierea ribosondelor *in vitro*

Ribosonde radioactive

Pentru a genera o sondă mono sau dublumarcată se amestecă următorii reactivi (Tabel 13). Matrița ADN liniarizată este la o concentrație de 1 μg/μl.

Tabel 13. Reactivi folosiți pentru obținerea ribosondelor radiomarcate

Reactivi	Ribosondă monomarcată	Ribosondă dublumarcată	Concentrația
Matriță ADN liniarizată	0,25 μl	0,25 μl	0,25 μl
Tampon de transcripție T3/T7/SP6 (5X) (Boehringer Mannheim)	2 μl	2 μl	1x
DTT 100 mM	1 μl	1 μl	10 mM
RNasin 40 U/μl	0,25 μl	0,25 μl	1 U/μl
AUG-TP ⁴ 5 mM	1 μl	-	500 μM
A,G-TP 5 mM	-	1 μl	500 μM
³⁵ S-UTP 1000 Ci/mmol*	-	5 μl	5 μl
³⁵ S-CTP 1000 Ci/mmol*	5 μl	5 μl	5 μM
ARNpolimerază T3/T7/SP6 50 U/μl	0,5 μl	0,5 μl	2,5 U/μl
Volum total	10 μl	10 μl	

*Limitarea la volumul final de 10 μl necesită uscarea ribosondelor radioactive. Se amestecă câte 5 μl de ³⁵S-UTP și ³⁵S-CTP și se usucă prin congelare. Se resuspendă sedimentul în 5 μl apă bidistilată sterilă și se adaugă la amestecul de reacție.

- Incubare 2 ore, la 37°C (matrițe mai scurte de 400 pb). Incubarea 4 ore la 30°C produce molecule transcript mai lungi pentru matrițe mai mari de 400 pb.
- Se adaugă 1 μ l DNAză I, 1 U/ μ l, pentru degradarea matriței ADN și se incubează la 37°C, 15 minute.
- Adăugare 89 μ l apă bidistilată.
- Se ia 1 μ l pentru a permite determinarea lungimii moleculelor transcript prin electroforeză. *Obținerea moleculelor transcript de lungime completă poate fi verificată pe electroforeză în gel de poli(acrilamidă), urmată de expunerea la un film autoradiografic.*
- Se adaugă 99 μ l 2x amestec hidroliză alcalină și se realizează hidroliza la 60°C, timpi variabili, în funcție de lungimea dorită. Fragmentele cuprinse între 0,2-0,4 kb sunt hidrolizate aproximativ 12 minute, cele de 0,5-0,9 kb 16 minute și cele mai lungi de 1 kb, 17 minute.
- Se adaugă 100 μ l fenol (saturat în tampon Tris-EDTA) și 1 μ l ARNt (10 mg/ml) după care se amestecă ușor.
- Se adaugă 100 μ l cloroform, se amestecă ușor și se centrifughează câteva minute. Se transferă faza apoasă într-un tub steril.
- Se adaugă 100 μ l Tris-EDTA la faza fenol/cloroform și se amestecă ușor. Centrifugare câteva minute. Se adaugă această fază apoasă la prima.
- Se măsoară 2 μ l de fază apoasă într-un scintilator. Se adaugă 20 μ l 3 M acetat de sodiu pH 5,2 și 440 μ l etanol absolut.
- Stocare cel puțin 30 minute, la -20°C.
- Centrifugare 30 minute, la 4°C și îndepărtarea cu grijă a supernatantului.
- Adăugare 500 μ l 70% etanol și stocare 10 minute, la -20°C.
- Centrifugare 10 minute și îndepărtarea cu grijă a supernatantului.
- Uscarea sedimentului într-o centrifugă cu vacuum, 10 minute.
- Dizolvarea sedimentului în tampon Tris – EDTA, cu 10 mM DTT, pentru a obține o concentrație finală de 106 cpm/ μ l.
- Se folosește 1 μ l din această soluție pentru a determina cpm încorporate (μ Ci).
- Stocare la -20°C.

Ribosonde neradioactive

Se amestecă următorii reactivi într-un tub steril (Tabel 14). Matrița ADN liniarizată ar trebui să aibă o concentrație de 1 μ g/ μ l.

Tabel 14. Reactivi folosiți pentru obținerea ribosondelor neradioactive

Reactivi	Cantitatea	Concentrația
Tampon T3/T7/SP6 5x	4 μ l	1X
DTT 100 mM	2 μ l	10 mM
Amestec ribosonde marcate 10X (Boehringer Mannheim)	2 μ l	1X
RNasin 40 U/ μ l	1 μ l	2 U/ μ l
ARN polimerază T3/T7/SP6 50 U/ μ l	1 μ l	2,5 U/ μ l
Matriță ADN liniarizată	1 μ l	1 μ g/ μ l
Apă bidistilată	9 μ l	
Volum total	20 μ l	

Amestecul de ribosonde marcate conține: 5X tampon de transcripție; 50% glicerol; 1 unitate μ l Klenow ADN polimeraza I; 5X soluție amestec primer (1 mM dATP, dCTP, dGTP, fiecare); 0,65 mM dTTP; și 0,35 mM DIG-11-dUTP, sau biotin-16-dUTP sau fluoresceină-12-dUTP. Incubare 1,5-2 ore la 37°C.

Se ia 1 μ l de amestec de reacție și se pune pe un gel de agaroză pentru a evalua calitatea sintezei ribosondelor marcate. Raportul dintre ADN și ARN servește ca referință pentru stabilirea cantității de ARN sintetizate; o bună sinteză ARN va furniza colorații de intensități asemănătoare pentru benzile de ADN și ARN.

- Se adaugă 1 μ l de DNază și se incubează la 37°C 15 minute.
- Se adaugă 3 μ l ARNt de drojdie (10 mg/ml), 380 μ l apă bidistilată, 32 μ l 5 M LiCl steril și 1000 μ l etanol absolut. Se precipită ribosonda marcată peste noapte, la -20°C.
- Centrifugare la 14000 rpm, 30 minute, la 4°C.
- Spălarea sedimentului cu 70% etanol.
- Centrifugare 10 minute și uscarea sedimentului, 30 minute, la temperatura camerei.
- Dizolvarea sedimentului în 80 μ l apă bidistilată, pentru a obține o concentrație finală de 0,1 μ g/ μ l (100 ng/ μ l).

2. Hibridizarea pe secțiuni

1. Fixare în 4% formaldehidă în tampon fosfat salin autoclavat.
2. Deshidratare, clarificare și includere în parafină.
3. Secționarea și montarea pe lame tratate cu 2% aminoalchilsilan în acetonă.
4. Deparafinare, incubare în etanol absolut și uscare.
5. Incubare 10 minute, în 2X SSC⁵, la 70°C.
6. Spălare 5 minute în apă bidistilată sterilă.
7. Digerarea țesutului cu proteinază K, la 37°C. *Durata tratamentului este în funcție de stadiul embrionar și de specie (Tabel 12).*
8. Stoparea digestiei enzimatice, prin spălare 30 de secunde cu 0,2% glicină în tampon fosfat salin.
9. Spălare, două băi de apă bidistilată sterilă, prima de 30 secunde și a doua de 5 minute.
10. Incubare 10 minute, în 10 mM dithiothreitol steril și uscare. *În cazul sondelor radiomarcate cu ³⁵S se lucrează în condiții reducătoare.*
11. Hibridizare. Se aduce amestecul de hibridizare 1,25X la temperatura camerei. Pentru obținerea a 100 μ l amestec de hibridizare se pipetează 80 μ l din amestecul de hibridizare 1,25X și se pune pe gheață. Se adaugă 1 μ l 1 M DTT, 2 μ l ADN din spermatozoizi de hering (10 mg/ml). Se adaugă apă bidistilată la probă, pentru a da un volum final de 17 μ l. Se fierb sondele ARNc 3 minute, la 80°C și se răcesc pe gheață. Se adaugă sonda denaturată la soluție și se păstrează pe gheață până în momentul folosirii. Se pipetează 6 μ l de amestec de hibridizare pe fiecare secțiune de 5 x 5 mm. Secțiunile mai mari necesită mai mult amestec de hibridizare. Se pun lamele într-o cutie închisă ermetic, ce conține hârtie de filtru înmuiată în 50% formamidă/1X SSC pentru împiedicarea evaporării amestecului de hibridizare. Incubare peste noapte la 54°C.
12. Spălarea lamelor cu câțiva ml de 1X SSC, pentru a îndepărta amestecul de hibridizare.
13. Spălare de două ori în 50% formamidă/1X SSC, la 54°C, 15 minute.

⁵Saline-sodium citrate

14. Spălare în 1X SSC, 10 minute.
15. Tratarea secțiunilor cu RNază A (10 µg/ml), 30 minute, la 37°C.
16. Spălare 1X SSC, 10 minute.
17. Spălare 0,1X SSC, 10 minute.
18. Deshidratare prin trei băi succesive de etanol 50%, 70%, 96%, ce conține 0,3 M acetat de amoniu, 3 minute fiecare baie.
19. Uscarea lamelor, cel puțin o oră înainte de aplicarea emulsiei în cazul sondelor radiomarcate.
20. Detectarea hibridizării se realizează în funcție de markerul sondei.

a. Sonde radiomarcate

Hibrizii radiomarcați sunt detectați pe baza capacității lor de a forma o imagine latentă într-o emulsie fotografică. Se folosește Ilford Nuclear Research Emulsion G-5, pentru detectarea ³⁵S. Emulsia trebuie stocată la 4°C, protejată de lumină. Se manipulează în condiții de întuneric (iluminare indirectă cu o sursă de 15 wați, echipată cu un filtru #902 Ilford, situată la 1,5 m deasupra zonei de lucru. Diluția emulsiei are un efect mare asupra semnalului și colorării nespecifice. În mod normal se folosește o diluție de 2,5X.

- Se dispersează emulsia la 40°C și se amestecă cu grijă.
- Se transferă 5 ml de emulsie în fiecare container de 20 ml, cu 7,5 ml amestec glicerol-apă. Se stochează la 4°C, în cutii închise. Se poate stoca cel puțin două luni.
- Se dispersează emulsia diluată, 10 minute, la 40°C, se amestecă ușor fără a forma bule de aer și se pune într-un tanc la 40°C.
- Se scufundă ușor, de două ori, lamele în emulsie și se scurge excesul câteva secunde.
- Se șterge spatele lamelor și se plasează pe o placă de sticlă prerăcită, 10 minute.
- Se usucă lamele în poziție orizontală, 60 minute, la temperatura camerei.
- Se așează lamele în poziție orizontală într-o cutie, la 4°C. Timpul de expunere variază între 4-10 zile, în funcție de izotopul încorporat în sondă.
- Se aduc toate soluțiile la temperatura de 18°C și se menține cutia cu lame pentru cel puțin 30 minute la temperatura camerei.
- Se dezvoltă 4 minute, cu agitare. Se stopează dezvoltarea 1 minut cu apă bidistilată.
- Fixare 10-15 minute în 30% tiosulfat de sodiu în apă bidistilată, cu agitare.
- Spălare cel puțin 60 minute cu apă de robinet (18°-20°C), cel puțin 30 minute la întuneric.
- Spălare în apă bidistilată, 5 minute.
- Contrastare cu soluție Nuclear Fast Red, 1 minut jumătate.
- Spălare de câteva ori în apă bidistilată.
- Deshidratare în etanol 50%, 70%, 96% și 100% cinci minute fiecare baie.
- Clarificare în trei băi de xilen, 5 minute fiecare baie și montare în malinol. *Granulele autoradiografice dispar dacă stau mult timp în xilen sau se folosesc alte medii de montare.*
- Uscare câteva zile la 37°C, înaintea stocării la temperatura camerei.

b. Sonde neradioactive

Se detectează imunohistochimic (vezi imunohistochimie). Hibrizii marcați cu biotină se pun în evidență cu avidină/streptavidină cuplată cu enzime, cele marcate cu digoxigenină cu anticorpi antidigoxigenină cuplați cu enzime iar cele cuplate cu fluorocromi se observă direct la microscopul de fluorescență.

3. Hibridizarea in toto

1. Fixarea embrionilor în 4% formaldehidă, în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20.
2. Deshidratare în metanol 25%, 50%, 75% în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, la temperatura camerei și stocare în metanol absolut la -20°C.
3. Rehidratarea embrionilor în metanol - tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, 75%, 50%, 25%, 15-20 minute fiecare baie, într-un tub Falcon de 50 ml, urmată de spălarea embrionilor în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, steril, 30 minute.
4. Digerarea embrionilor în 10 µg/ml proteinază K în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, la 37°C. Timpul de incubare depinde de stadiul de dezvoltare (vezi tabelul 12).
5. Spălare în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, steril.
6. Post-fixare 30 minute, în 4% formaldehidă - 0,1% glutaraldehidă în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, steril.
7. Spălare ușoară în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, steril.
8. Plasarea embrionilor în tuburi de reacție sterile de 2 ml.
9. Spălarea embrionilor 15 minute într-un ml de amestec de hibridizare : tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, în raport de 1:1.
10. Spălare 15 minute într-un ml de amestec de hibridizare.
11. Prehibridizare 1-1,5 ore la 70°C în amestec de hibridizare.
12. Denaturarea ribosondelor marcate cu digoxigenină prin fierbere 3-5 minute, la 90°C și răcire pe gheață. Se adaugă aproximativ 100 ng de sondă marcată cu digoxigenină/ml de amestec de hibridizare. Concentrația optimă a probei variază între 0,1-1 µg/ml.
13. Se pun toate tuburile de reacție, de 2 ml, într-un tub Falcon de 50 ml, cu hârtie de filtru înmuiată în 2X SSC. Hibridizare peste noapte, la 70°C.
14. Clătire de două ori în amestec de hibridizare, preîncălzit la 70°C. Spălare de două ori, 30 minute fiecare baie, în amestec de hibridizare preîncălzit la 70°C.
15. Spălare în amestec de hibridizare : tampon Tris salin (1:1), la temperatura camerei, 30 minute.
16. Spălare scurtă cu tampon Tris salin, la temperatura camerei. Se transferă embrionii în tuburi de 6 ml și se spală de două ori în tampon Tris salin, 30 minute fiecare baie.
17. Detactarea ribosondei. Toate soluțiile conțin 5 mM levamisole (concentrație finală). Blocarea legării nespecifice, o oră, cu 2% reactiv de blocare în tampon Tris salin și 10% ser de oaie. Se transferă embrionii în tuburi de reacție de 2 ml.
18. Incubarea embrionilor peste noapte, la 4°C, cu anticorp antidigoxigenină, cuplat cu fosfatază alcalină, diluat 1:2000, în tampon Tris salin, cu 2% reactiv de blocare și 10% ser oaie.
19. Îndepărtarea anticorpului și transferarea embrionilor în tuburi de 6 ml unde se spală de două ori cu MABT⁶. Se spală câteva ore până la 2 zile cu agitare constantă.

⁶Maleic acid buffer-Tween 20

20. Clătirea embrionilor de două ori în NTMT⁷. Spălare de două ori în NTMT cu agitare constantă, 15 minute fiecare spălare.
21. Transferarea embrionilor în tuburi de reacție de 2 ml. Incubare cu soluție Purple AP la întuneric. Semnalul ar trebui să fie vizibil în 30 minute pentru ARNm abundente (de exemplu miozină).
22. Stoparea reacției de culoare prin spălarea embrionilor în apă bidistilată.
23. Post-fixare în 4% formaldehidă în tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20, peste noapte.
24. Stocare în glicerol : tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20 (1:1), la 4°C.

II. TEHNICI IMUNOHISTOCHIMICE

Localizarea și caracterizarea unei molecule celulare sau extracelulare în embrioni reprezintă o etapă esențială a oricărui studiu ce urmărește elucidarea bazelor moleculare ale proceselor embrionare. Imunohistochimia⁸ este o metodă foarte specifică, care se bazează pe folosirea unui anticorp ca reactiv pentru localizarea unor componente celulare sau extracelulare.

A. Tipuri de anticorpi și metode imunohistochimice

Anticorpii sunt reprezentați de imunoglobuline alcătuite din patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele și două lanțuri ușoare. Imunoglobulinele sunt molecule bifuncționale, ce prezintă două situsuri de legare a antigenului, numite Fab și un situs de legare a celulelor sau complementului numit Fc.

Majoritatea anticorpilor folosiți în imunohistochimie sunt imunoglobuline capabile să se lege de un antigen prin intermediul unui situs specific numit epitop.

În studiile de imunohistochimie se folosesc două tipuri de anticorpi: (1) policlonali; (2) monoclonali.

Tabel 15. Avantajele și dezavantajele anticorpilor mono- și policlonali

Anticorpi	Avantaje	Dezavantaje
Policlonali	Ușor de preparat Aviditate mare	Necesită purificarea antigenului Necesită purificarea anticorpului Reacții nespecifice Reproductibilitate variabilă Producere limitată
Monoclonali	Obținerea de anticorpi față de antigeni nepurificați Producere permanentă și reproductibilă Specificitate de epitop mare	Lipsa avidității (nu recunoaște decât un epitop de pe antigen) Reacții încrucișate când același epitop există pe mai multe proteine

Anticorpii policlonali se obțin prin stimularea antigenică repetată a unui animal (șoarece, iepure, oaie, capră, porc). **Anticorpii monoclonali** sunt produși prin fuziune celulară. Limfocitele B de la animalul imunizat fuzionează cu o linie celulară

⁷NaCl-Tris-MgCl₂-Tween-20

⁸Preferăm termenul de imunohistochimie în cazul în care detectarea antigenelor se realizează pe secțiuni de țesut sau pe embrioni întregi. Termenul de imunocitochimie îl asociem cu detectarea antigenelor pe culturi de celule.

imortalizată (tip mielom), derivată din tumorile plasmactice. Hibridul posedă atât proprietățile de creștere nelimitată, caracteristice mielomului cât și capacitatea limfocitelor B de a sintetiza anticorpi. În tabelul 15 sunt prezentate avantajele și dezavantajele celor două tipuri de anticorpi.

Metodele imunohistochimice sunt de două tipuri: (1) directe; (2) indirecte.

În **metoda directă** anticorpul marcat interacționează direct cu antigenul celular sau extracelular (Fig.126A).

Metoda indirectă implică două etape. În prima etapă, anticorpul primar nemarcat interacționează cu antigenul și formează un complex antigen-anticorp invizibil. În a doua etapă, țesuturile sunt incubate cu un anticorp secundar marcat, produs prin imunizarea altei specii cu imunoglobulina care a furnizat anticorpul primar (Fig.126B).

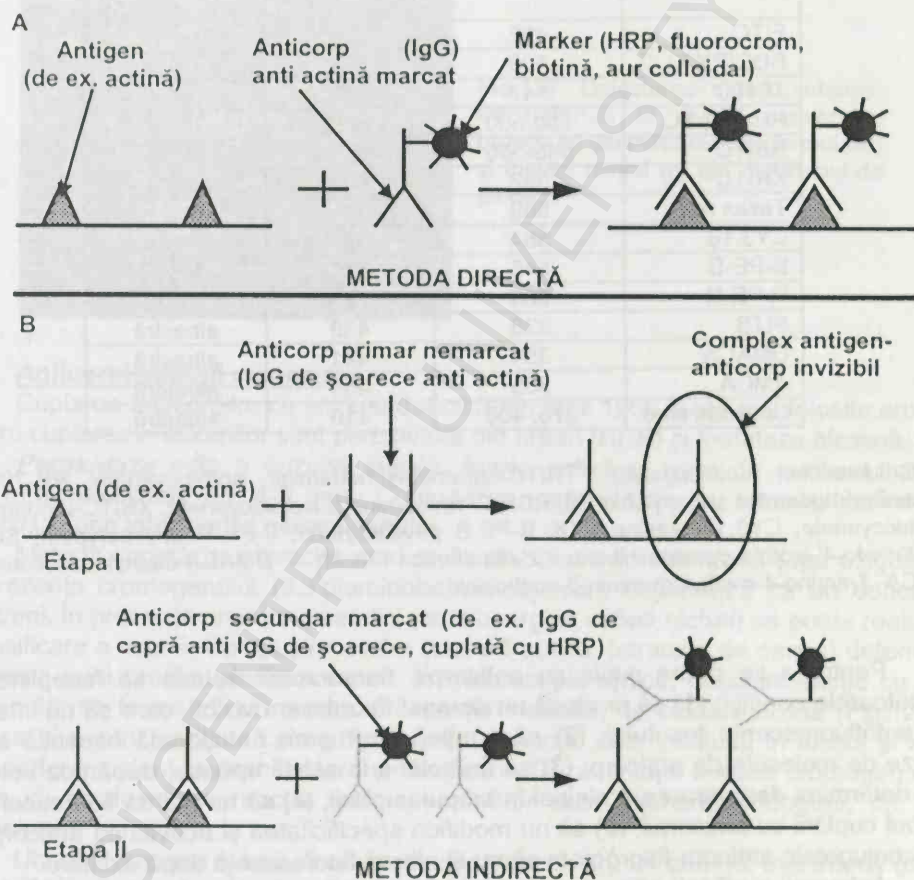


Fig.126. Schema imunohistochimiei directe (A) și indirecte (B).

Anticorpul folosit ca reactiv citochimic este marcat pentru a putea fi vizualizat în microscopia optică sau electronică. Ei pot fi marcați cu: (1) fluorocromi; (2) enzime; (3) aur coloidal; (4) biotină.

Anticorpi cuplați cu fluorocromi

Cuplarea anticorpilor cu fluorocromi se bazează pe formarea unei legături covalente între fluorocrom și imunoglobulină, reacție care are loc la pH alcalin. Gradul de conjugare al celor două componente depinde de timp și temperatură. Izotiocianații reacționează cu grupările amino libere ale anticorpilor, în special cu gruparea ϵ -amino a lizinei, formând o legătură tiocarbamidă. Deoarece majoritatea cercetătorilor folosesc anticorpi cuplați cu fluorocromi disponibili comercial nu se va face referire la protocolul de conjugare. Din numărul mare de fluorocromi cunoscuți, pentru imunofluorescență se folosesc un număr redus (Tabel 16).

Tabel 16. Fluorocromi cuplați cu anticorpi

Fluorocrom	Excitație (nm)	Emisie (nm)	Culoarea fluorescenței
FITC	492	516-525	galben-verzui
BODIPY FL-2	503	512	galben-verzui
TRITC	547	572	roșie
RB-200-SC	550-560	575-585	roșie
RBITC	545-560	570-580	roșie
XRITC	582	601	roșie
Texas red	589	615	roșie
CY3.18	554	568	roșie
B-PE-B	545	575	roșie
R-PE-R	565	578	roșie
SITS	336	438	albastră
DMACA	354	441	albastră
AMCA	355	450	albastră
Cascade blue	375, 400	410	albastră

FITC-fluorescein isothiocyanate; TRITC-tetramethylrhodamine isothiocyanate; RB-200-SC-lissamine rhodamine sulfonylchloride; RBITC- rhodamine B isothiocyanate; XRITC-rhodamine X isothiocyanate; CY3.18-cyanine 3,18; B-PE-B phycoerythrin; R-PE-R phycoerythrin; SITS-4-acetamido-4'-isothio-cyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid; DMACA-diethylaminocoumarin; AMCA- 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetic acid.

Pentru a se putea cupla cu anticorpii, fluorocromii trebuie să îndeplinească următoarele condiții: (1) să producă un semnal fluorescent vizibil, care să nu interfere cu autofluorescența țesutului; (2) să conțină o grupare funcțională capabilă să se fixeze de molecula de anticorp; (3) să fie solubil în soluții apoase, deoarece solvenții pot determina denaturarea proteinei în timpul cuplării; (4) să nu piardă fluorescența în timpul cuplării cu anticorpii; (5) să nu modifice specificitatea și activitatea anticorpului; (6) conjugatele anticorp-fluorocrom să nu-și piardă fluorescența după excitare.

Anticorpii purificați prin cromatografie de afinitate și marcați cu fluorocromi au o fluorescență nespecifică mai scăzută decât fluorescența serului și a fracțiilor IgG. Gradul de conjugare al fluorocromului cu anticorpu se poate determina prin citirea absorbției.

FITC și TRITC sunt fluorocromii preferați pentru cuplarea imunoglobulinelor, deoarece interacționează rapid cu acestea, produc conjugate stabile și determină o fluorescență puternică. Dintre aceștia, fluoresceina produce cea mai intensă fluorescență. Ea este sensibilă la variațiile de pH, maximul emisiei fluorescente fiind la

un pH de 8-9. Dezavantajul major al fluoresceinei este reprezentat de creșterea vitezei de fotodecolorare. Fotodecolorarea este un fenomen care are loc în momentul expunerii țesutului o perioadă lungă de timp la lumina de excitație și conduce la atenuarea fluorescenței. Acest aspect variază în funcție de fluorocrom.

Dezavantajele folosirii anticorpilor fluorescenți cuprind: (1) necesită pentru vizualizarea complexului imun microscopie speciale, de fluorescență (confocale); (2) evaluare dificilă a detaliilor de bază; (3) preparate cu durată de viață scurtă, datorită pierderii semnalului fluorescent (fotodecolorare).

În ciuda acestor dezavantaje, imunofluorescența este simplă, rapidă și produce un semnal intens (Fig. 127, pentru varianta color vezi Planșa 15).

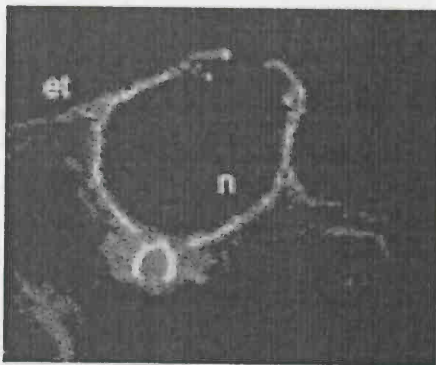


Fig.127. Detectarea metaloproteazelor (MMP-2) la nivelul membranei bazale ce delimitează ectodermul (et) și tubului neural (n) din embrionul de găină.

Anticorpi cuplați cu enzime

Cuplarea anticorpilor cu enzime datează din anul 1966. Cele mai folosite enzime pentru cuplarea anticorpilor sunt peroxidaza din hrean (HRP) și fosfataza alcalină.

Peroxidaza este o enzimă stabilă, foarte activă și ușor de purificat, cu un diametru molecular de 4-5 nm. Conjugarea peroxidazei cu imunoglobuline se realizează prin intermediul glutaraldehidei.

Metoda constă în interacția markerului enzimatic cu substratul (apa oxigenată) în prezența cromogenului (3,3'-diaminobenzidină), care acționează ca un donor de electroni. În prezența unor ioni metalici (osmiu, argint, cobalt, nichel) se poate realiza o intensificare a culorii. Compușii metalici (clorură aurică, tetraoxid de osmiu) determină formarea unui produs electrono-opac. În microscopia optică, după interacția cu apa oxigenată, se formează un produs de reacție insolubil, de culoare brună (Fig. 128 și Planșa 16 pentru varianta color). Produsul de reacție este insolubil în alcool și xilen fiind astfel rezistent la deshidratare și clarificare. Dezavantajul acestui cromogen este acela că produsul de reacție este asemănător unor pigmenți endogeni, de tipul melaninei.

Un alt cromogen folosit, 3-amino-9-etilcarbazol, are un semnal mai intens (roșu) decât DAB și nu interacționează cu pigmenții endogeni. În schimb acest cromogen este solubil în alcool și secțiunile nu pot fi deshidratate și montate permanent.

Alți cromogeni cunoscuți dar mai puțin utilizați sunt 4-cloro-1-naftol și tetrametilbenzidină care formează precipitate albastre.

În cursul tehnicii imunoperoxidazice pot apărea următoarele aspecte: (1) formarea instantanee a precipitatului este un indiciu că anticorpul secundar cuplat cu peroxidază trebuie diluat; (2) incubarea prelungită cu substratul poate intensifica colorația de fond și inhibă contrastarea nucleară.

Comparativ cu fluorocromii, peroxidaza are următoarele avantaje: (1) folosirea de microscopie mai puțin sofisticate; (2) sensibilitate mai mare și identificare ușoară a celulelor marcate, în special în contextul unei morfologii complicate; (3) vizualizarea în microscopia optică și electronică.

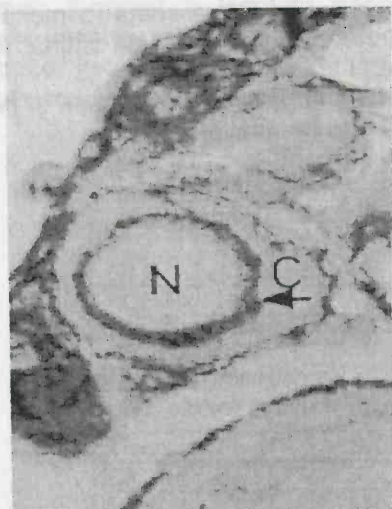


Fig.128. Detectarea α -tubulinei (săgeata), cu anticorpi secundari marcați cu HRP, în ovocite previtelogenice de *Rana ridibunda*. N-nucleu. C-citoplasmă. (După Zărnescu, 2002).

Dezavantajele reacției imunoperoxidazice includ: (1) procedură de marcarea prea lungă, cu etape suplimentare (blocarea peroxidazei endogene); (2) intensificarea colorației de fond.

Țesuturile pot avea propria activitate peroxidazică (datorită în special enzimelor mieloperoxidază și catalază din macrofage) care interferează cu reacția peroxidazică dezvoltată în cursul reacțiilor imunocitochimice. Din acest motiv, înaintea reacției imunohistochimice se realizează o etapă de blocare a peroxidazei endogene. Cea mai folosită metodă este cea de blocare cu 3% apă oxigenată, 10-30 minute, la temperatura camerei. Această metodă este foarte eficientă pentru distrugerea completă a activității peroxidazei endogene, fără afectarea imunoreactivității antigenului.

S-au dezvoltat mai multe variante de tehnici imunohistochimice cu peroxidază. Cele mai cunoscute sunt PAP și CARD (pentru caracterizarea altor metode vezi Bunea și Zărnescu, 2001)

Metoda Peroxidază-Anti Peroxidază (PAP) se bazează pe formarea unui complex ciclic stabil, cu trei molecule de peroxidază și doi anticorpi. PAP a fost elaborată pentru a evita problemele conjugării anticorpilor cu enzime și pentru amplificarea numărului de molecule enzimatică ce pot fi direcționate la un anumit situs. HRP ea însăși o proteină imunogenă este inoculată la o specie pentru a genera un răspuns imun policlonal. Antiserul este recoltat și plasat în soluție cu enzima, astfel încât complexe imune formate rămân solubile. Aceste complexe sunt formate din două molecule de IgG și trei molecule de HRP. Nu numai că acest complex rămâne solubil, dar activitatea enzimatică a HRP nu este afectată de atașarea imunoglobulinelor. Anticorpii anti HRP sunt de la aceeași specie care a produs anticorpii primari (Brattbauer, 1994). Acești doi anticorpi, unul față de antigenul din țesut și celălalt față de HRP pot fi legați printr-un anticorp secundar produs în altă

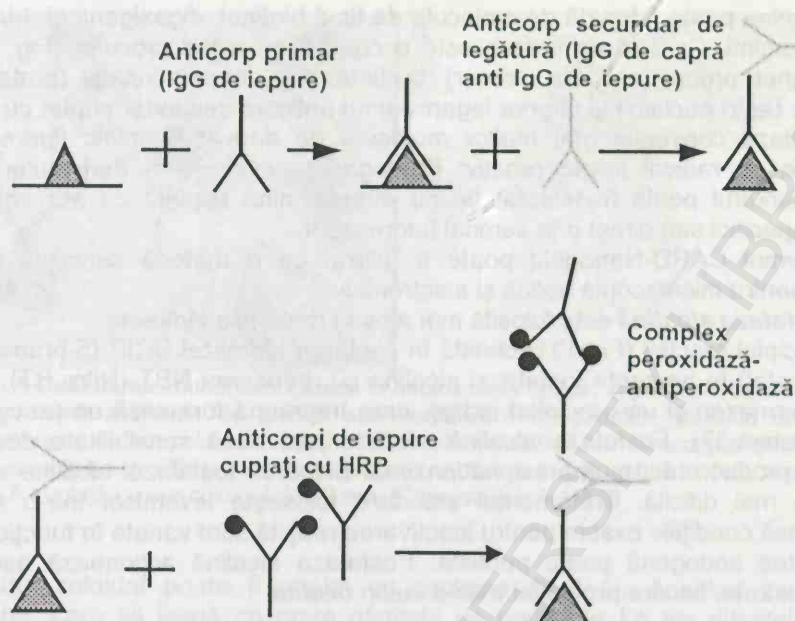


Fig.129. Schema metodei peroxidază-anti peroxidază (PAP).

specie, față de imunoglobulina de la prima specie (de exemplu, anticorpi de capră anti IgG de iepure) (Fig.129). Deși de fapt rezultatele finale ale metodei PAP nu sunt întotdeauna mai bune decât cele din metoda indirectă, gradul mare de purificare și legarea specifică o fac o metodă sensibilă foarte populară (Van Noorden, 1986).

Metoda CARD (Catalysed Reporter Deposition) se bazează pe introducerea moleculelor de HRP la un situs specific antigen-anticorp, pentru a cataliza atașarea covalentă a unui număr mare de molecule tiramină pe secțiunile de țesut. După oxidarea de către HRP, în prezența apei oxigenate are loc activarea tiraminei, care se leagă covalent la proteină.

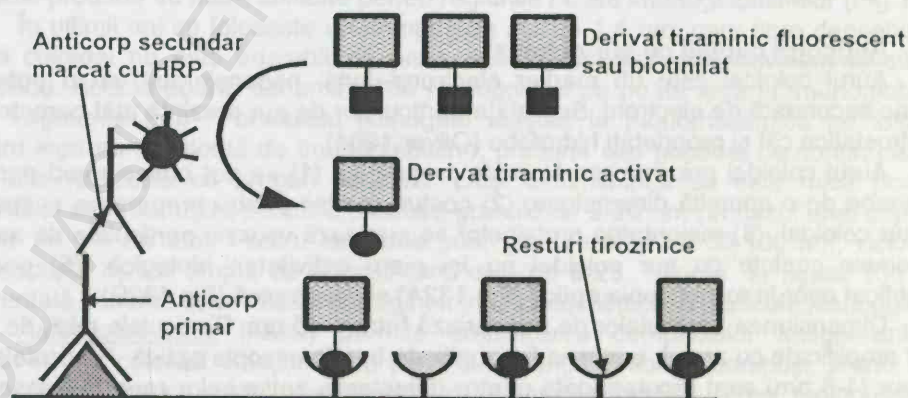


Fig.130. Schema metodei CARD.

Tiramina poate fi legată de molecule de tipul biotinei, digoxigeninei, trinitrofenol, FITC, rodamină, Cy-3. Amplificarea este o combinaire a trei procese (Fig. 130): (1) legarea unei probe (anticorp primar) la țintă prin imunoafinitate (proteine) sau hibridizare (acizi nucleici) și ulterior legarea unui anticorp secundar cuplat cu HRP; (2) HRP mediază conversia mai multor molecule de derivat tiraminic fluorescent sau biotinitat la un radical foarte reactiv; (3) legarea covalentă a derivatului tiraminic activat. Markerul poate fi detectat fie cu streptavidină cuplată cu aur coloidal, cu anticorpi specifici sau direct prin semnal fluorescent.

Sistemul CARD-Nanogold poate fi utilizat ca o metodă sensibilă de înaltă rezoluție pentru microscopia optică și electronică.

Fosfataza alcalină este folosită mai ales în metodele indirecte.

Principiul reacției (Fig.131) constă în cuplarea hidrolizei BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat) în prezența fosfatazei alcaline cu reducerea NBT (Nitro BT), pentru a produce formazan și un precipitat indigo, care împreună formează un precipitat roșu închis (Planșa 17). Fosfataza alcalină oferă o mai bună sensibilitate decât HRP, deoarece produce mai mult precipitat/enzimă. Blocarea fosfatazei alcaline endogene este însă mai dificilă. Tratamentul standard folosește levamisol într-o etapă de blocare, însă condițiile exacte pentru inactivarea reușită sunt variate în funcție de țesut și activitatea endogenă poate persista. Fosfataza alcalină acționează asupra mai multor substraturi, fiecare precipitat având culori diferite.

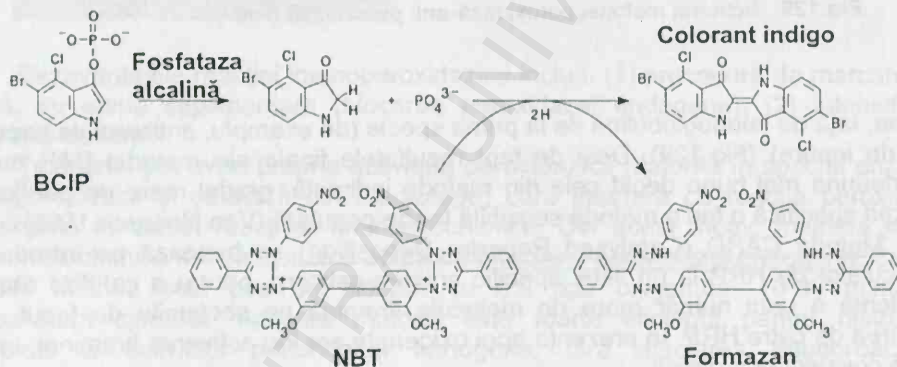


Fig.131. Principiul detectării fosfatazei alcaline în prezența substratului NBT/BCIP.

Anticorpi cuplați cu aur coloidal

Aurul coloidal este un marker electrono-dens, nedecolorabil, cu o puternică emisie secundară de electroni. Suprafața particulelor de aur prezintă atât caracteristici electrostatice cât și proprietăți hidrofobe (Oliver, 1994).

Aurul coloidal prezintă următoarele proprietăți: (1) se pot obține rapid particule omogene de o anumită dimensiune; (2) costuri reduse pentru prepararea suspensiei de aur coloidal; (3) majoritatea proteinelor se cuplează ușor cu particulele de aur; (4) proteinele cuplate cu aur coloidal nu își pierd activitatea biologică; (5) poate fi identificat ușor în microscopia optică (Fig.132A) și electronică (Fig.132B).

Dimensiunea particulelor de aur variază între 1-40 nm. Particulele mici, de 1 nm sunt amplificate cu argint, pentru a fi vizualizate în microscopia optică. Particulele mici de aur (1-3 nm) sunt recomandate pentru detectarea antigenelor rare, în criosecțiuni ultrafine.

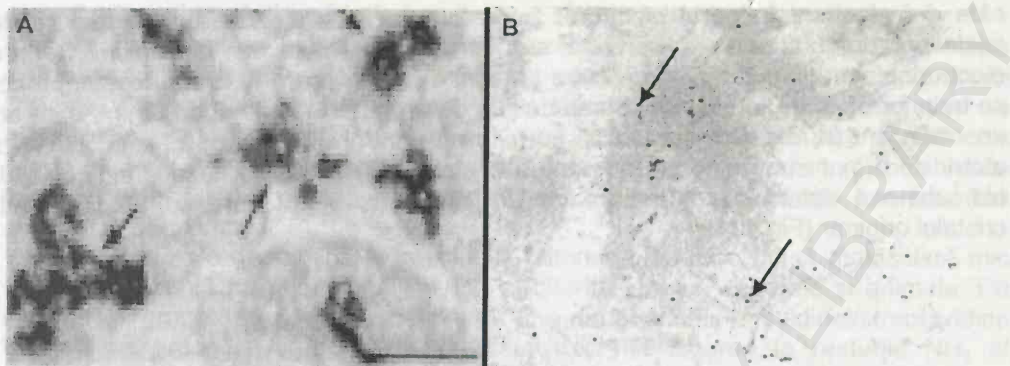


Fig.132. A-Detectarea imunohistochimică în microscopia optică, după intensificare cu argint, a unei proteine secretate de glanda submandibulară de șobolan, folosind un anticorp secundar cuplat cu aur coloidal (săgeți). B-Detectarea actinei în microscopia electronică, în cortexul ovocitului de *Rana ridibunda* (săgeți). Anticorpul anti actină a fost vizualizat cu proteina A cuplată cu aur coloidal de 10 nm. (Zărnescu și al., 1997).

Aurul coloidal poate fi cuplat cu proteina A și G. Acestea sunt proteine bacteriene, care se leagă cu mare afinitate de porțiunile Fc ale diferitelor clase și subclase de imunoglobuline la diferite specii (Tabel 17).

Tabel 17. Afinitatea proteinelor A și G pentru imunoglobuline

Proteina	Afinitatea pentru imunoglobuline
Proteina A	IgG1, IgG2, IgG4, IgM, IgE - umane Toate IgG de capră Toate IgG de șoarece (fără IgG1)
Proteina G	IgG3 umană IgG1 șoarece

Proteina A este un component al peretelui celular de la *Staphylococcus aureus* în timp ce *proteina G* este prezentă în peretele celular al unor linii de streptococi G. Ambele proteine au mare afinitate pentru regiunile Fc ale imunoglobulinelor (Fig.133).

În ultimii ani se folosește un compus de aur de 1,4 nm, care spre deosebire de aurul coloidal nu este adsorbit de proteine, ci interacționează covalent la situsuri specifice. Acesta poartă denumirea de Nanogold și se poate lega la imunoglobuline sau fragmente Fab'. Particulele Nanogold atașate la monomaleimidă se folosesc pentru legarea covalentă de imunoglobuline, proteine sau peptide, ce conțin cisteină sau alte molecule cu grupări sulfhidril. Deși dimensiunea sa este mică poate fi amplificat ușor cu argint pentru a produce granule de 2-20 nm (în cazul unei expuneri scurte de 1-5 minute). Pentru formarea unor granule mari de 30-100 nm, vizibile în microscopia optică timpul de intensificare este de 8-25 minute. În figura 134 este prezentată schema intensificării cu argint a imunocitochimiei cu particule Nanogold.

Autometalografia (AMG) permite amplificarea complexelor antigen-anticorp cuplat cu aur coloidal. Secțiunile de țesut care conțin astfel de compuși, atunci când sunt plasate într-o soluție de dezvoltare autometalografică atrag moleculele de hidrochinonă și ioni de argint din soluție. Fiecare moleculă de hidrochinonă cedează

A

Antigen + Anticorp → Anticorp + Proteina A/G → Anticorp + Proteina A/G cuplată cu aur coloidal

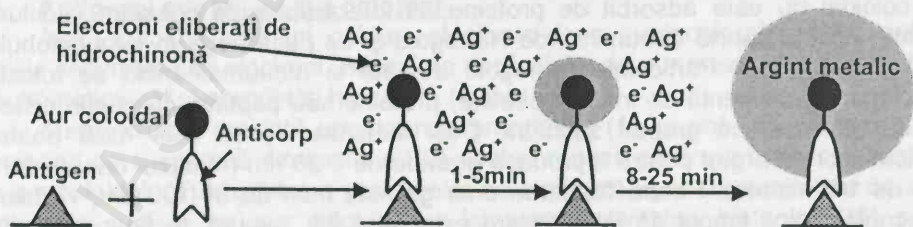
METODA DIRECTĂ

B

Antigen + Anticorp primar → Anticorp primar + Anticorp secundar → Anticorp secundar + Proteina A/G cuplată cu aur coloidal → Anticorp secundar + Proteina A/G cuplată cu aur coloidal

METODA INDIRECTĂ

Coloidul protector care inhibă reacția autocatalitică dintre sarea de argint și agentul reducător și asigură distribuția uniformă a componentelor în cursul dezvoltării este reprezentat de guma arabică.



224

Anticorpi cuplați cu biotină

Toate metodele avidină-biotină se bazează pe patru aspecte: (1) afinitatea extraordinară dintre moleculele de avidină și biotină, care pot forma un complex stabil; (2) posibilitatea de a cupla biotina cu molecule mari, de tipul enzimelor sau anticorpilor, printr-o singură reacție biochimică; (3) posibilitatea marcării avidinei cu diferiți markeri, de tipul enzimelor, metalelor grele sau fluorocromilor; (4) posibilitatea folosirii avidinei ca o punte, între două molecule biotinilate diferite, de tipul unui anticorp și peroxidazei.

Biotina este o vitamină hidrosolubilă (vitamina H), cu o masă moleculară mică (244 D), prezentă în gălbenușul oului și în diferite țesuturi vegetale și animale. Prin intermediul grupării ureido se asociază cu una din adânciturile avidinei/streptavidinei, în timp ce gruparea carboxil este responsabilă de legarea la resturile NH_2 ale diferitelor proteine.

Biotinilarea reprezintă procedeul chimic prin care biotina este conjugată la diferite molecule (enzime, lectine, acizi nucleici). Datorită dimensiunii mici a biotinei, biotinilarea nu modifică proprietățile chimice, imunologice sau fizice ale moleculelor biotinilate. În plus, se pot atașa mai multe molecule de biotină pe un anticorp sau enzimă. Se pot lega peste 150 de molecule de biotină la un anticorp. Biotinilarea necesită inițial activarea biotinei prin esterificare. Gruparea carboxil a biotinei activate va interacționa ulterior cu grupările amino ale proteinei ce urmează a fi biotinilată.

După biotinilare, există pericolul ca reacția dintre biotina prezentă pe macromoleculele marcate și avidină să fie împiedicată steric, cu reducerea numărului de avidine legate și pierderea ulterioară a sensibilității. Pentru a evita aceste dezavantaje este inserat un braț spațiator între biotină și macromoleculă. Brațul spațiator, cu o lungime de 7, 11, sau 16 atomi, acționează ca o punte între grupul amino terminal al biotinei și gruparea carboxil a macromoleculei, lărgind distanța dintre ele.

Avidina este o glicoproteină de 66 kDa, încărcată pozitiv, cu un punct izoelectric de 10,5, foarte abundentă în albușul oului, din care este extrasă. Este formată din patru subunități, fiecare alcătuită dintr-un lanț polipeptidic de 128 aminoacizi. Resturile zaharidice ale fiecărei subunități includ un oligozaharid ce conține manoză și glucozamină.

Caracteristica cea mai importantă a structurii terțiare a moleculei de avidină este prezența pe suprafața sa a patru adâncituri hidrofobe (câte una pentru fiecare subunitate), care reprezintă situsuri de legare specifice pentru patru molecule de biotină (Coggi și al., 1996).

Se presupune că resturile încărcate pozitiv și lanțurile oligozaharidice pot interacționa nespecific cu suprafețele celulare încărcate negativ și acizii nucleici.

Avidina poate fi marcată cu un fluorocrom (rodamină, fluoresceină), o enzimă (peroxidază, fosfatază alcalină, β -galactozidază), feritină sau aur coloidal. Fluorocromii pot fi legați la avidină prin intermediul unui derivat izotiocianat, enzimele și feritina sunt cuplate prin intermediul glutaralhidei, în timp ce aurul coloidal de diferite dimensiuni (5-40 nm) poate fi adsorbit la avidină prin forțe electrostatice necovalente.

Streptavidina este o proteină neglicozilată, de 60 kDa, cu punct izoelectric neutru, extrasă din culturile de *Streptomyces avidinii*. Lipsa resturilor oligozaharidice și punctul izoelectric neutru o fac superioară avidinei. În schimb, prezintă cele patru adâncituri hidrofobe, de care se pot atașa molecule de biotină. Conține o tripeptidă Arg-Tyr-Asp (RYD), ce mimează secvența de legare RGD a fibronectinei. Această

secvență de recunoaștere universală leagă integrine și molecule de suprafață celulară înrudite. Colorările nespecifice asociate streptavidinei sunt atribuite acestei tripeptide.

Aspectul principal al metodelor imunohistochimice cu avidină-biotină este acela că anticorpul biotinitat folosit ca anticorp primar (metode directe) sau secundar (metode indirecte) poate fi vizualizat în trei moduri: (1) cu avidină marcată (Fig.135); (2) cu avidina acționând ca o punte între anticorp și enzimele biotinite (Fig.136); în această metodă anticorpul biotinitat, care poate fi primar sau secundar interacționează inițial cu avidina nemarcată. Ulterior, peroxidaza biotinitată interacționează cu situsurile de legare rămase libere pe molecula de avidină. Această metodă a fost abandonată în favoarea altora mai avansate. (3) avidină-biotină-complex peroxidazic (ABC) (Fig.137).

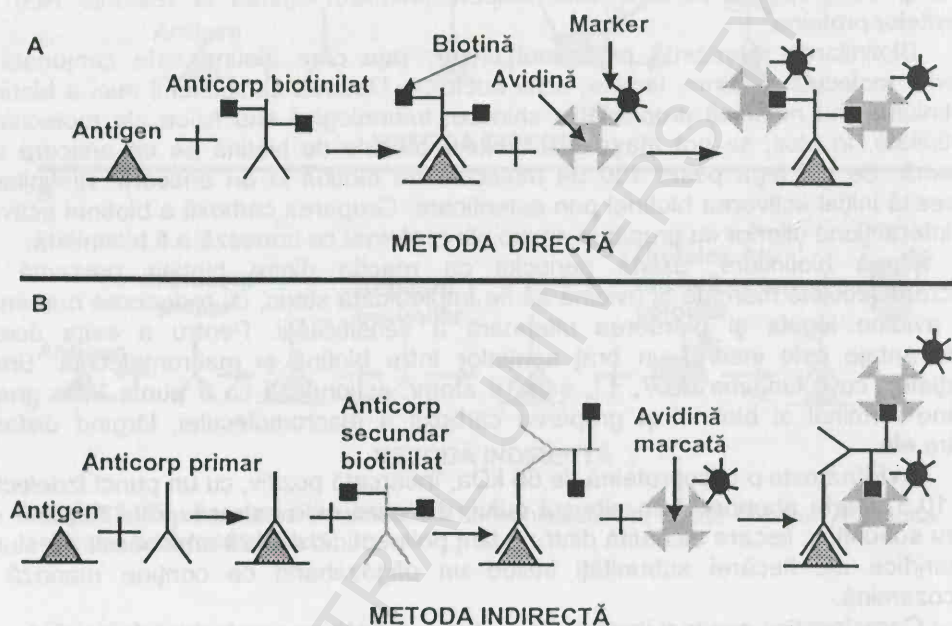


Fig.135. Schema metodei directe (A) și indirecte (B) în cazul imunocitochimiei cu avidină marcată.

Avantajele metodelor avidină-biotină sunt următoarele: (1) foarte sensibile; (2) versatile; (3) detectarea antigenelor în cantități mici; (4) colorație nespecifică redusă.

Dezavantajele metodelor imunohistochimice cu avidină/streptavidină - biotină sunt următoarele: (1) datorită biotinei endogene, prezente în diferite țesuturi și organe de tipul ficat, rinichi, glande mamare, țesut adipos, avidina se poate lega de biotina endogenă, determinând rezultate fals pozitive; (2) granulele mastocitelor leagă avidina marcată cu fluorocromi sau enzime. Acest aspect poate fi evitat prin folosirea streptavidinei sau prin creșterea pH-ului reacției la 9,4; în aceste condiții imunoreacția nu va fi afectată și granulele mastocitelor nu vor lega avidina; (3) mulți embrioni (de exemplu, de pasăre) conțin cantități mari de biotină și avidină și aceste metode imunohistochimice nu sunt potrivite.

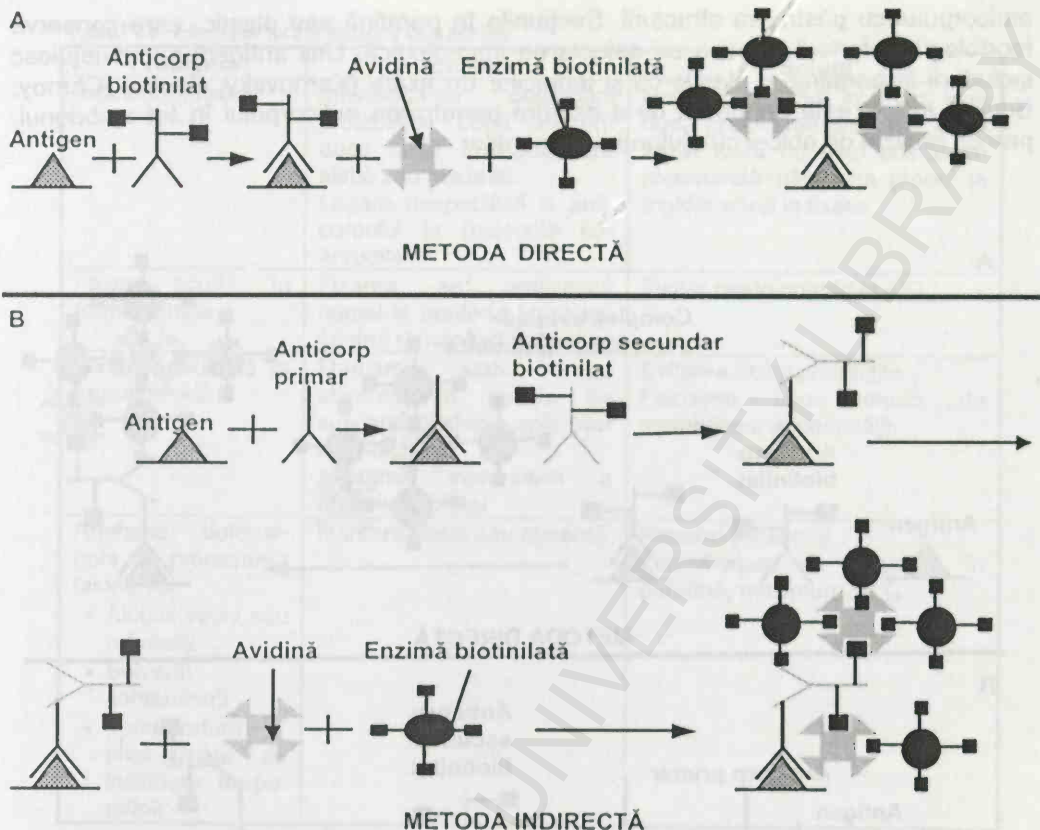


Fig.136. Schema metodei directe (A) și indirecte (B) în cazul imunohistochimiei cu avidină și enzime biotilnate.

B. Fixarea țesuturilor

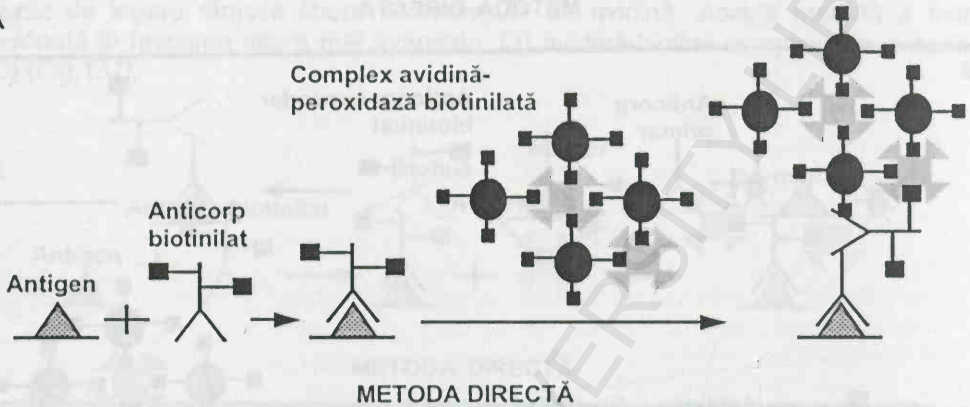
Materialul embrionar, în special cel în stadiile timpurii ale dezvoltării prezintă probleme speciale. Uneori este dificil de a găsi compromisul corect între conservarea antigenului, sensibilitatea metodei de localizare și o păstrare bună a structurii.

Principala cauză a variației în reproductibilitate a tehnicilor imunohistochimice este fixarea țesuturilor. În tabelul 18 sunt prezentate problemele asociate fixării și prelucrării țesuturilor.

La nivelul microscopiei optice, există două metode complementare de a localiza antigenele specifice: pe secțiuni și *in toto*. În secțiuni, este ușor de determinat tipurile celulare, care exprimă antigenul de interes, dar este mai dificil de obținut o vedere generală a distribuției tridimensionale. Deși localizarea *in toto* este recomandabilă pentru studierea distribuției regionale, este dificil în acest caz de a descrie exprimarea într-o populație celulară. Uneori se poate realiza imunohistochimia *in toto*, după care se secționează respectivul embrion pentru a obține mai multe detalii despre modelele de exprimare în diferite țesuturi. Ambele metode ridică probleme tehnice specifice. În secțiunile de țesut este important de a combina sensibilitatea și conservarea

anticorpului cu păstrarea structurii. Secțiunile în parafină sau plastic, care conservă morfologia, interferează adesea cu detectarea imunologică. Unii antigeni supraviețuiesc includerii în parafină și plastic ca și tehnicilor de fixare (Karnovsky, Zenker, Carnoy, Bouin). *In toto* este important de a asigura penetrarea anticorpului în tot embrionul, proces realizat de obicei cu ajutorul detergenților.

A



B

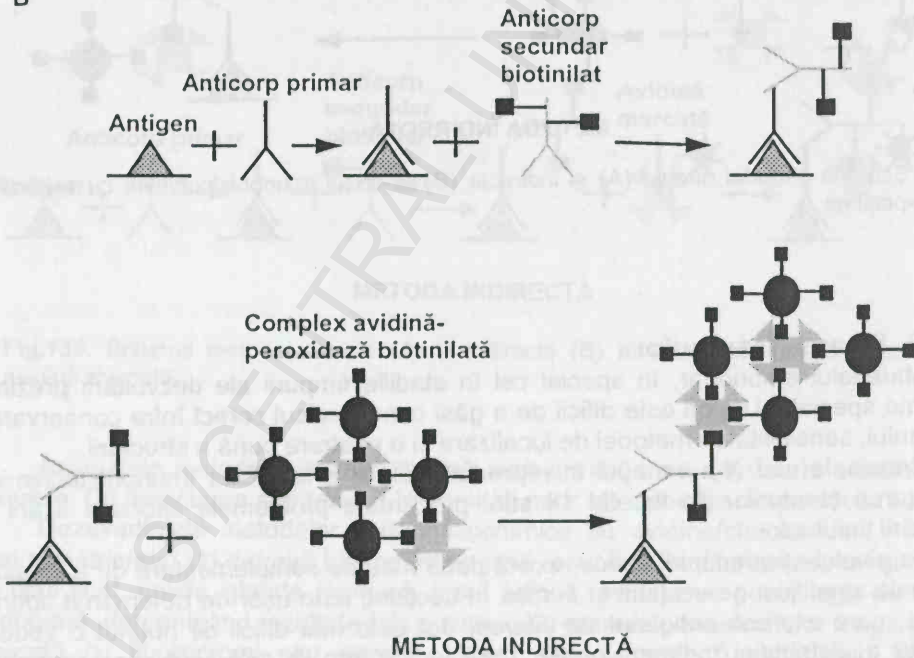


Fig.137. Schema metodei directe (A) și indirecte (B) în cazul imunohistochemiei cu avidină-biotină-complex peroxidazic (ABC).

Tabel 18. Efectele fixării asupra ţesuturilor

Problema	Efecte	Soluţii
Întârzierea fixării	Intensificarea degradării proteolitice, ceea ce conduce la o imunocolorare slabă sau absentă Legare nespecifică a anticorpului la molecule ne-ânrudite	Realizarea fixării la scurt timp după prelevarea ţesutului; dacă acest lucru nu este posibil se recomandă păstrarea probei la frigider până la fixare
Fixare scurtă în formaldehidă	Fixarea se realizează numai la periferia ţesutului, centrul rămânând nefixat	Fixare peste noapte la 4°C
Fixare prelungită în formaldehidă	Marcare slabă sau absentă, în funcţie de susceptibilitatea epitopilor individuali Alterarea ireversibilă a anumitor epitopi	Evitarea fixării prelungite Folosirea unor tehnici de restabilire a antigenităţii
Artefacte determinate de procesarea ţesuturilor <ul style="list-style-type: none"> • Alcoolii vechi sau refolosiţi • Solvenţi contaminaţi • Temperatura prea mare de includere în parafină 	Marcare slabă sau absentă	Reactivi proaspeţi Temperatura de includere în parafină, maximum 56°C

În condiţii ideale, fixarea ţesuturilor şi celulelor nu ar trebui să modifice şi compoziţia chimică. Pentru imunohistochimie fixatorul trebuie să păstreze structura celulelor şi să împiedice pierderea şi/sau migrarea antigenelor. Din păcate, fixatorii care nu afectează epitopii antigenici nu sunt în general buni pentru păstrarea morfologiei, în timp ce aceia care păstrează morfologia alterează situsurile antigenice. Pierderea antigenităţii creşte odată cu concentraţia fixatorului şi durata fixării.

Există două tipuri de fixatori: (1) coagulanţi; (2) agenţi de legare încrucişată.

Fixatorii coagulanţi de tipul alcoolului etilic şi acetonei acţionează prin înlocuirea apei, ruperea legăturilor de H şi alterarea structurii terţiare a proteinelor. Ei precipită proteinele solubile, însă glucidele şi acizii nucleici nu se fixează. Aceste molecule sunt îndepărtate în cursul spălării ţesuturilor. Lipidele membranare şi citoplasmice sunt solubilizate şi extrase. Înlocuirea apei determină deshidratarea celulelor şi distrugerea majorităţii organelor citoplasmice. La temperaturi scăzute (de la 0 la -20°C) etanolul precipită proteinele fără a le denatura şi este eficient pentru fixarea antigenelor cu greutate moleculară mare de tipul proteinelor citoscheletice. Antigenele cu greutate moleculară mică (<100 kDa) sunt în general extrase. Deşi agenţii coagulanţi tind să inducă artefacte (deshidratarea celulelor, citoplasmă granulară/reticulară) ei sunt eficienţi în microscopia optică, în special pentru antigenii cu greutate moleculară mare şi proteinele structurale polimerizate.

Agenţii de legare încrucişată sunt reprezentaţi de formaldehidă/paraformaldehidă şi glutaraldehidă.

Formaldehida este un gaz incolor, solubil în apă. Preparatele comerciale apoase de formol conțin 37-40% (w/w) gaz solubilizat. Acestea conțin de asemenea acid formic (<0,05%) și 10-15% metanol, care este adăugat pentru împiedicarea polimerizării formaldehidei în paraformaldehidă. Metanolul și acidul formic fac acest fixator necorespunzător pentru structurile fine. Paraformaldehida este o formă polimerizată a formaldehidei, ce disociază la 60°C și pH neutru. Pentru imunohistochimie sunt preferate soluțiile de paraformaldehidă proaspăt preparate, deoarece nu conțin aditivi folosiți în mod normal pentru conservare. Formaldehida împiedică extracția collagenului, dar nu fixează polizaharidele solubile. Mucopolizaharidele acide nu sunt fixate, decât dacă sunt legate de proteine. Formaldehida este un fixator bun pentru lipide, în special dacă este inclus în fixator 1-2 mM Ca^{2+} sau Mg^{2+} . Fixarea membranei este îmbunătățită prin reducerea extragerii lipidelor. În unele cazuri, spălarea prelungită a țesuturilor poate să restabilească antigenitatea proteinelor fixate.

Deoarece fixatorii de legare încrucișată acționează prin formarea de legături chimice, pot avea loc modificări conformaționale severe ale proteinelor, datorită modificării grupărilor reactive. Acești fixatori pot determina artefacte fie prin legarea antigenelor cu greutate moleculară mică la proteinele structurale mai mari sau prin blocarea sterică a anticorpului. Datorită solubilității în soluții apoase, antigenii proteici și glucidici pot fi extrași în cursul fixării. Anticorpul sunt molecule mari de imunoglobuline care au distanța dintre brațe de 146Å. Moleculele de această dimensiune nu pot difuza în sau afară din celule.

Glutaraldehida este un fixator foarte eficient pentru păstrarea structurilor fine. Fixarea cu glutaraldehidă este cuplată de obicei în microscopia electronică cu postfixarea cu tetraoxid de osmiu. Postfixarea scade sever antigenitatea proteinelor pentru imunodetecție, fie prin clivarea proteinelor, oxidarea sau modificările de conformație induse de tetraoxidul de osmiu. Fixarea numai cu glutaraldehidă scade de asemenea antigenitatea proteinelor.

Deoarece este o dialdehidă, glutaraldehida acționează prin intermediul celor două grupări aldehydice, pentru a lega încrucișat proteinele. Glutaraldehida este mult mai reactivă cu gruparea ϵ -amino a lizinei. Legăturile intramoleculare sunt predominante asupra legăturilor intermoleculare și au loc modificări conformaționale majore, datorită alterării structurilor α -helicale. Modificările formei proteice pot conduce la scăderea imunogenității prin blocarea sau mascarea epitopilor reactivi. Reacțiile glutaraldehydei cu zaharurile nu sunt încă complet înțelese. Fixatorul interacționează cel mai probabil cu compușii polihidroxi pentru a forma polimeri în mucopolizaharide. Fixarea cu glutaraldehida este ireversibilă. Impuritățile din glutaraldehidă, de tipul cianurilor și arsenicului din unele preparate comerciale pot contribui la reducerea antigenității proteinelor. Puritatea soluției de glutaraldehidă poate fi verificată prin determinarea raportului $A_{235/280}$. O valoare mai mare de 0,2 este asociată în general cu soluțiile impure.

Fixarea incompletă cu formaldehidă sau glutaraldehidă poate determina artefacte serioase în imunohistochimie, datorită grupărilor aldehydice libere. Aceste grupări aldehydice, dacă sunt lăsate nemodificate pot interacționa cu anticorpul, legându-i nespecific la proteine. Pentru reducerea grupărilor aldehydice libere se folosește tratamentul cu 0,05-0,1 glicină; 1 mg/ml borohidru de sodiu/potasiu sau clorură de amoniu. Această etapă este critică după fixarea cu glutaraldehidă, care este o aldehydă bifuncțională. În cursul fixării, un capăt se poate lega de componentele celulare, celălalt rămânând liber. Dacă acest capăt nu este blocat, se leagă de

proteinele din soluția de blocare sau de anticorpus primar. Grupările aldehidice libere din fixator pot determina o autofluorescență de fond în imunofluorescență.

În cazul imunohistochimiei *in toto*, embrionii trebuie să fie permeabili pentru molecule de 150000D (IgG) sau 900000 D (IgM). Fixarea nu trebuie să afecteze difuzia moleculelor în și din probă și să păstreze structura celulară. Cel mai folosit fixator este fixatorul alcoolic Dent, ce conține patru părți metanol și o parte DMSO. Acesta conservă structurile celulare și țesuturile și permite anticorpilor să pătrundă în embrion (Klymkowsky și Hanken, 1991). DMSO permeabilizează țesuturile.

C. Albirea embrionilor

În afara opacității lor, mulți embrioni sunt intens pigmențați (de exemplu, cei de amfibieni). Pigmentul interferează cu vizualizarea anticorpului și colorarea histochimică. Albirea se realizează cu 10% apă oxigenată, în fixator Dent, 2-7 zile. Deși mai persistă pigment în retină, acesta nu interferează cu vizualizarea probei. În plus, acest procedeu blochează și activitatea peroxidazei endogene. Albirea are un efect minor asupra antigenității unei game largi de anticorpi monoclonali. De fapt, unii anticorpi care nu interacționează cu moleculele țintă în embrionii fixați în metanol, interacționează puternic după albire, ceea ce sugerează că etapa de albire poate uneori descoperi epitopi neaccesibili.

D. Permeabilizarea țesuturilor

Fixatorii, în special cei care leagă încrucișat, acționează asupra proteinelor membranare și reduc permeabilitatea plasmalemei. Astfel, este necesară permeabilizarea membranei plasmatică și cea a organelor pentru a permite accesul anticorpilor la antigenii intracelulari sau cei din organe.

Se folosesc trei tipuri de agenți de permeabilizare: (1) solvenți; (2) saponine și lecitine; (3) detergenți neionici.

Solvenții de tipul alcoolilor și acetonei sunt cei mai simpli agenți de permeabilizare a membranelor. Ei acționează prin dizolvarea lipidelor membranare, făcându-le permeabile pentru anticorpi. Datorită efectului coagulant asupra proteinelor, acești solvenți realizează în același timp atât fixarea cât și permeabilizarea.

Saponinele sunt compuși naturali derivați din plante. Ele reprezintă cei mai buni agenți de permeabilizare în cazul localizării antigenelor citoplasmatică. Acționează asupra membranelor prin interacția cu fosfolipidele, colesterolul și proteinele. Tratamentul cu saponină desface asocierile dintre colesterol și fosfolipide, determinând formarea unor deschideri membranare de 120-150 Å, asociate cu pierderea minimă a colesterolului. Unele din aceste deschideri membranare sunt tranzitorii, în timp ce altele sunt permanente, majoritatea fiind formate la 10-20 secunde după tratamentul cu saponină. Datorită naturii tranzitorii a unor astfel de deschideri membranare se recomandă ca saponina să fie inclusă în toate soluțiile folosite în cursul imunohistochimiei.

Lizolecitinele acționează prin dizolvarea colesterolului și conduc la pierderi masive ale sterolilor din membrană. În membranele plasmatică ale eritrocitelor, lizolecitinele determină formarea unor deschideri de 300-400 Å în diametru. Spre deosebire de saponine, deschiderile membranare realizate de lizolecitină sunt permanente.

Detergenții neionici (Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20, Brij 35, etc) sunt folosiți adesea în tehnicile imunohistochimice deoarece ei nu denaturează proteinele. Detergenții acționează prin intercalarea în bistraturile lipidice, solubilizând proteinele.

Proteinele hidrofobe sunt învelite în detergent și îndepărtate prin spălare. Pentru unii antigeni, în special cei localizați în mitocondrii sau nucleu, tratamentele cu detergenți neionici sunt necesare datorită faptului că membranele acestor organite nu conțin cantități mari de colesterol și nu pot fi permeabilizate de saponine.

Tratamentele cu detergenți neionici sunt considerate blânde, deși detergenții cu lanțuri hidrocarbonate lungi pot denatura unele proteine. În unele preparate comerciale de Triton X-100 și Brij 35 s-au descoperit niveluri ridicate de impurități oxidative, capabile de a interacționa cu grupările sulfhidril din proteine. Acești compuși oxidativi pot conduce la pierderea antigenității și dau o autofluorescență de fond. Unele proteine integrale pot fi îndepărtate din membrana plasmatică și membranele organitelor de către tratamentele cu detergenți, chiar dacă celulele au fost fixate. Asemenea extracții ale proteinelor hidrofobe pot sugera eronat lipsa reactivității cu anticorpii (Melan, 1994).

E. Restabilirea antigenității

Artefactul major indus de fixarea cu formaldehidă este cel al mascării antigenelor din țesuturi datorită legării încrucișate a proteinelor. Alterările implică structura terțiară și cuaternară a proteinelor, în timp ce structura primară și secundară sunt neafectate. Alterarea sterică rezultată determină mascarea epitopilor. Cei mai cunoscuți antigeni alterați prin fixare sunt PCNA⁹, Ki-67, unele citokeratine, Bax¹⁰, Bcl-2¹¹. Agenții care restabilesc antigenitatea trebuie să cliveze legăturile formate în cursul fixării, proces care determină reconstrucția structurii tridimensionale, origine a epitopului. Cele mai cunoscute tehnici care pot demasca epitopii antigenici alterați prin fixare, procesare, stocare sau datorită interacției cu rășini sintetice sunt reprezentate de digestia enzimatică și tratamentul termic (Werner și al., 1996).

Digestia enzimatică cu tripsină, pronază, proteinază K sau pepsină este foarte folosită pentru restabilirea antigenității după fixarea cu formaldehidă. Doarece situsurile de clivaj ale acestor enzime sunt nespecifice pot fi afectați și epitopii. Dezavantajul major al acestor tratamente enzimatică este testarea timpului de incubare și a concentrației enzimatică pentru fiecare tip de țesut și durată de fixare. Cel mai frecvent se folosește 0,4% pepsină în 0,01N HCl, 30-90 minute sau 0,1% tripsină în tampon Tris pH 7,8, 30 minute. Ambele tratamente se realizează la 37°C.

Tratamentul termic este o metodă superioară celor enzimatică deși mecanismul nu este complet înțeles. S-a sugerat că denaturarea proteinelor determină expunerea epitopilor. Sărurile metalice sau ureea adăugate în tamponul de fierbere acționează prin desfacerea structurii terțiare a proteinelor. În plus, căldura poate furniza energia necesară ruperii legăturilor încrucișate formate în cursul fixării cu formaldehidă între ionii de calciu sau alți cationi metalici divalenți și proteine. Tamponul în care sunt incubate secțiunile precipită ionii metalici eliberați. Compoziția tamponului și pH-ul acestuia sunt două componente esențiale pentru reușita restabilirii antigenității. Cele mai bune rezultate se obțin prin fierberea secțiunilor sub presiune, 4 minute în 10 mM tampon citrat, pH-6.

⁹Proliferating cell nuclear antigen, antigen nuclear de proliferare celulară, engl.

¹⁰Bcl-2 associated x protein, proteină x asociată Bcl-2, engl.

¹¹B cell lymphoma/leukemia 2, proteină care în stare mutantă produce limfoame/leucemii.

F. Blocarea legării nespecifice

Una din problemele metodelor imunohistochimice este cea a disponibilității anticorpilor pentru interacții neimune. Acest aspect este datorat unor receptori care recunosc regiunile Fc ale imunoglobulinelor, aspect care determină atașarea anticorpilor la situsuri neantigenice. Pentru a evita acest aspect țesuturile se tratează cu ser neimun de la aceeași specie care a furnizat anticorpus secundar și albumină serică bovină. Ca agenți de blocare se mai folosesc ovalbumina, gelatina bovină (2%) sau gelatina din tegumentul de pește. Trebuie avut în vedere ca proteina aleasă pentru blocare să nu interacționeze cu niciunul din reactivii folosiți (de exemplu, serul normal de iepure nu poate fi folosit împreună cu proteina A cuplată cu aur coloidal). Imunoglobulinele serului normal acoperă situsurile de legare Fc, astfel încât ele nu sunt disponibile pentru anticorpus primar iar anticorpus secundar nu le identifică, pentru că aparțin aceleiași specii. Când anticorpus primar este cuplat cu proteina A, care se atașează la regiunile Fc ale imunoglobulinelor, albumina este mai recomandată decât serul normal.

G. Imunohistochimia dublă

Această metodă implică vizualizarea a doi antigeni în aceeași secțiune. În cazul anticorpilor cuplați cu fluorocromi, se pot detecta trei antigene simultan prin folosirea de anticorpi secundari cuplați cu FITC, TRITC sau fluorocromi cu fluorescență albastră. Anticorpii primari se amestecă și se aplică pe secțiune. La fel și anticorpii secundari. Secțiunea de țesut se observă la microscopul de fluorescență cu filtre corespunzătoare fiecărui fluorocrom. Imunohistochimia dublă se poate realiza și cu anticorpi secundari cuplați cu enzime, unul cu HRP, celălalt cu fosfatază alcalină. În acest caz, se dezvoltă inițial reacția peroxidazică.

Metoda necesită ca anticorpii utilizați să aparțină unor clase diferite de imunoglobuline (IgM, IgG) sau să fie produși la diferite specii (șoarece, iepure, șobolan). Dacă acest lucru nu este posibil se folosesc anticorpi cuplați direct cu fluorocromi, enzime sau biotină (Fig.138).

H. Martorii imunohistochimiei

Includerea martorilor în imunohistochimie este foarte importantă pentru interpretarea rezultatelor.

Martorii negativi pot fi de mai multe tipuri: (1) anticorpus primar înlocuit de tampon; (2) anticorpus primar înlocuit de ser neimun de la aceeași specie; (3) anticorpus primar înlocuit de un anticorpus de la aceeași specie, care este neimun sau este specific unui antigen cunoscut, dar absent în țesutul respectiv; (4) anticorpus secundar înlocuit de albumină serică bovină conjugată cu aur coloidal, la aceeași diluție și de aceeași dimensiune ca particulele de aur folosite pentru cuplarea anticorpului secundar; (5) preadsorbția anticorpului cu antigenul care urmează a fi detectat, procedeu care determină pierderea activității, în timp ce preadsorbția cu un antigen neânrudit nu afectează antigenitatea.

Martorii pozitivi pot fi reprezentați de țesuturi în care distribuția antigenului a fost caracterizată.

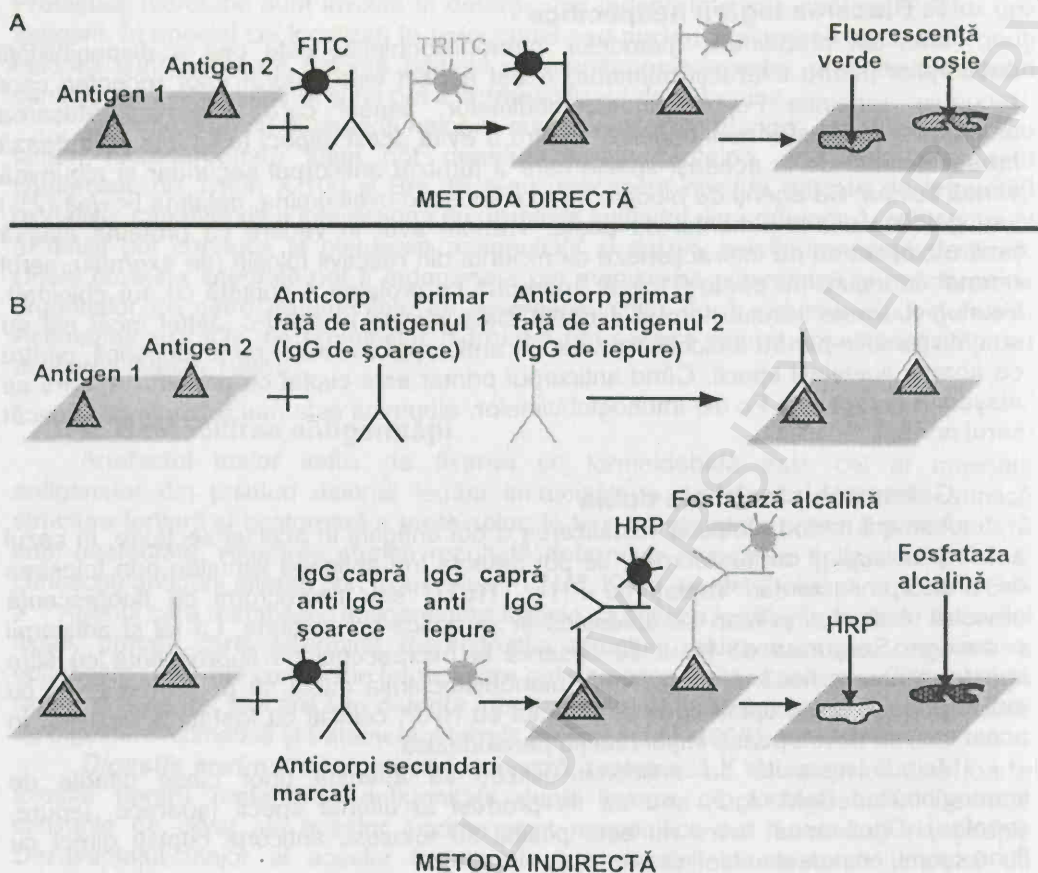


Fig.138. Schema metodei directe (A) și indirecte (B) în cazul imunohistochimiei duble.

Protocol experimental - imunohistochimia în microscopia optică

1. Fixare în 4% paraformaldehidă în tampon fosfat salin (pH 7,4), 2-16 ore, în funcție de dimensiunea embrionului, la 4°C sau în fixator Bouin, 2-16 ore la temperatura camerei.
2. Deshidratare prin concentrații crescătoare de alcool etilic, clarificare și includere în parafină.
3. Secționare la microtom, secțiuni cu grosimi cuprinse între 5-7 μ și întinderea lor pe lamă. Deparafinarea secțiunilor prin două băi de xilen, 5 minute fiecare baie, două băi etanol absolut, 3 minute fiecare baie, etanol 90%, 3 minute, etanol 70%, 3 minute, etanol 50%, 3 minute.
4. Incubare 5 minute în apă distilată (pentru metoda cu peroxidază) sau în tampon fosfat salin.
5. Blocarea peroxidazei endogene cu 3% H_2O_2 , 10-30 minute, la temperatura camerei, urmată de spălare cu apă distilată, două băi, a câte 2 minute fiecare baie și cu tampon fosfat salin, 2 băi, a câte 2 minute fiecare baie.

6. Se șterge cu hârtie de filtru spatele, marginile lamei și în jurul secțiunilor, care vor fi plasate în interiorul unei zone delimitate cu creionul diamant; acest procedeu împiedică soluția de blocare să se împrăștie pe lamă (Fig.139).
7. Se acoperă secțiunile cu soluția de blocare (500 μ l, 10% ser neimun sau 2% albumină serică bovină în tampon fosfat salin), se plasează într-o "cameră" umedă (cutie pe fundul căreia se așează hârtie de filtru umezită cu tampon fosfat salin) și se incubează la temperatura camerei, 20 minute.

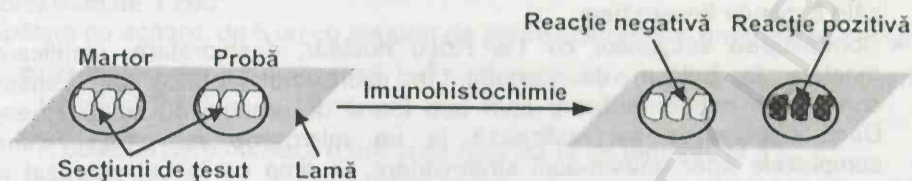


Fig.139. Delimitarea zonelor de țesut martor și probă pentru imunohistochimie.

8. Se îndepărtează soluția de blocare prin aspirare cu o micropipetă și se incubează cu anticorul primar, în cameră umedă, 60 minute, la temperatura camerei. Anticorul primar este diluat în tampon fosfat salin cu 2% albumină serică bovină. Dacă este necesar se realizează incubarea peste noapte la 4°C.
 9. Se spală lamele în tampon fosfat salin, patru băi, 5 minute fiecare baie.
 10. Se șterge cu hârtie de filtru în jurul secțiunii și se incubează cu anticorul secundar diluat în tampon fosfat salin, în cameră umedă, 30 minute, la temperatura camerei. Acesta poate fi marcat cu fluorocromi, HRP, fosfatază alcalină sau biotinitat.
 11. Se spală lamele în tampon fosfat salin, patru băi, 5 minute fiecare baie.
- Continuarea metodei depinde de tipul de detecție ales.

Anticorp secundar fluorescent

- Secțiunile de țesut se montează în Gelvatol, pentru reducerea fotodecolorării și se observă la microscopul de fluorescență cu filtrul corespunzător. *Lamele se pot monta și într-un amestec glicerol : tampon fosfat salin (9:1), la care se adaugă 1-2 mg/ml fenilendiamină.* Lamele imunofluorescente pot fi păstrate pentru câteva zile, la 4°C, ferite de lumină (acoperite cu folie de aluminiu).

Anticorp secundar cuplat cu fosfatază alcalină

- Developarea complexului imun se realizează prin incubarea la temperatura camerei, la întuneric, 30-60 minute cu substratul pentru fosfatază alcalină: nitro blue tetrazoliu (NBT)/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfat (BCIP). Pentru a se evita supracolorarea se verifică periodic la microscop.
- Stoparea reacției enzimatică prin spălare în tampon fosfat salin, 10 minute.
- Montarea în mediu apos (90% glicerol în tampon fosfat salin) și vizionare la microscop. Prezența antigenului este indicată de un precipitat de culoare roșu închis.

Anticorp secundar cuplat cu peroxidază

- Developarea reacției peroxidazice, prin incubarea 5 minute în 0,05% DAB în tampon fosfat salin, pH 7,4, la întuneric. Se adaugă H₂O₂ la o concentrație finală de 0,003% și se incubează încă 2-10 minute.
- Stoparea reacției prin spălare în apă de robinet, care intensifică produsul de reacție (il înegrește). Opțional se poate intensifica reacția prin incubarea 10 minute în 0,5% sulfat de cupru dizolvat în 0,9% NaCl, urmată de 5 pălări cu apă de robinet, 3 minute fiecare spălare.

- Deshidratare în alcool etilic, clarificare în xilen și montare în balsam de Canada. Regiunile din țesut pozitive pentru imunoperoxidază apar colorate în maro închis.

Anticorp secundar marcat cu aur coloidal sau Nano gold

- Intensificare cu argint prin incubarea secțiunilor la întuneric, 5-15 minute în soluție autometalografică.
- Stoparea dezvoltării prin spălare cu apă distilată la 40°C.
- Fixare cu 5% tiosulfat de sodiu, 5 minute și spălare cu apă distilată, două băi a câte 5 minute fiecare baie.
- Contrastarea secțiunilor cu 1% Roșu nuclear, deshidratare, clarificare și montare în balsam de Canada. În microscopia optică de transmisie complexe antigen-anticorp apar sub formă de granule de culoare neagră. Dacă observarea se realizează la un microscop cu câmp întunecat complexe apar galben-aurii strălucitoare, în timp ce la cel polarizat apar argintii.

Anticorp secundar biotinitat

- Incubare cu avidină/streptavidină cuplată cu fluorocromi/peroxidază/fosfatază alcalină, 45 minute la temperatura camerei.
- Spălare tampon fosfat salin, 4 băi, câte 5 minute fiecare baie.
- Dezvoltarea reacției imune depinde de markerul avidinei/streptavidinei și se realizează prin una din metodele de mai sus.

Protocol experimental - imunohistochimie in toto

Protocolul pentru imunocolorarea embrionilor întregi, sau a unor organe este similar celui descris mai sus. Incubările și spălările sunt mai lungi, pentru a permite penetrarea anticorpilor. Pentru a facilita pătrunderea reactivilor în embrioni se adaugă detergenți. Ca o regulă, embrionii mai mari necesită mai mult detergent și timpi mai lungi de incubare. În timpul tuturor incubărilor și spălărilor este foarte importantă agitarea ușoară. Embrionii de insecte și amfibieni necesită câteva modificări, care să permită penetrarea anticorpilor prin anvelopele viteline rigide și transparentizarea lor.

1. Embrioni de șoarece

1. Se colectează embrionii în tampon fosfat salin sau mediu de cultură. Dacă se recoltează embrioni timpurii, până în stadiul de câteva somite se recomandă adăugarea de ser (5%) pentru a reduce adezivitatea. Se îndepărtează membranele extraembrionare pentru a facilita pătrunderea anticorpului. Embrionii mai avansați (9 zile jumătate - 10 zile jumătate) se taie în jumătate, înainte sau după fixare.
2. Fixare în fixator Dent, preparat proaspăt, la 4°C, peste noapte.
3. Se transferă embrionii în soluția metanol:DMSO:H₂O₂ (4:1:1), proaspăt preparată, la temperatura camerei, 5-10 ore. Acest tratament este necesar pentru blocarea activității peroxidazei endogene (prezentă de exemplu în celulele sangvine). Se stochează apoi embrionii individual sau în grup în 100% metanol. Embrionii se pot stoca câteva luni la -20°C.
4. Rehidratarea embrionilor la temperatura camerei, în tuburi Eppendorf în următoarea secvență:
 - 50% metanol (1 ml), 30 minute cu agitare. Se îndepărtează soluția cu o pipetă Pasteur sau cu o micropipetă.

- Tampon fosfat salin (1 ml), 30 minute cu agitare (dacă embrionii se lipesc de pereți se siliconizează tubul).
 - Tampon de permeabilizare preparat extemporaneu, două băi, a câte o oră fiecare baie, cu agitare. *Pentru că embrionii odată fixați devin foarte fragili, agitatea nu trebuie să fie prea puternică.*
5. Incubare cu agitare, într-un ml de anticorp primar, diluat în tampon de permeabilizare, la 4°C, peste noapte. Diluția corectă se determină empiric. Diluția tipică este de 1:200.
 6. Spălare cu agitare, de 5 ori cu tampon de permeabilizare, în următoarea secvență:
 - Prima spălare se realizează cu 1 ml tampon, o oră, la 4°C, după care se transferă în tuburi de 15 ml.
 - A doua spălare durează o oră și se face cu 10 ml tampon, la 4°C.
 - A treia și a patra spălare se realizează la temperatura camerei, cu 10 ml tampon. Fiecare spălare durează o oră.
 7. Se transferă embrionii în tuburi Eppendorf și se incubează într-un ml de anticorp secundar, diluat 1:500, în tampon de permeabilizare, la 4°C, peste noapte, cu agitare.
 8. Se spală ca în etapa 6.
 9. Spălare în 5 ml tampon fosfat salin - 0,2% BSA - 5% Triton X-100 (preparat extemporaneu), 20 minute cu agitare.
 10. Incubarea embrionilor 30 minute, în tuburi Eppendorf, cu 1 ml DAB/NiCl₂ la temperatura camerei. *Nichelul intensifică reacția de culoare și produce precipitate gri sau roșii. În locul nichelului se poate folosi cobaltul.*
 11. Se adaugă H₂O₂ la o concentrație finală de 0,03% și se agită până ce intensitatea culorii este optimă, de obicei 2-10 minute.
 12. Postfixare în 4% paraformaldehidă, în tampon fosfat salin. *Fără postfixare, precipitatul se va decolora la lumină, în special atunci când se fotografiază.*
 13. Clătirea embrionilor cu 1 ml tampon fosfat salin - 0,2% BSA - 5% Triton X-100, urmată de spălarea lor, 30 minute, la temperatura camerei, cu agitare.
 14. Deshidratarea embrionilor după următoarea secvență:
 - 50% metanol (1 ml), 30 minute, la temperatura camerei, cu agitare.
 - 80% metanol (1 ml), 30 minute, la temperatura camerei, cu agitare.
 - Metanol absolut (1 ml), 30 minute, la temperatura camerei, cu agitare.
 15. Incubare în alcool benzilic : benzoat de benzil 1:2 (500 μl), 10 minute. *Acest amestec clarifică embrionii și permite observarea și fotografierea lor. Se plasează embrionii într-un vas Petri de sticlă. Amestecul este toxic.*
- Embrionii colorați *in toto* pot fi secționați. Pentru aceasta embrionii se transferă din metanol absolut și se procesează în felul următor:
- Două băi etanol absolut, o oră fiecare baie.
 - Două băi de toluen, o oră fiecare baie.
 - Amestec toluen : parafină (1:1), o oră.
 - Parafină lichidă, la 57°C, o oră.
 - Includere în parafină, secționare la microtom și montare pe lame de sticlă. Pentru contrastare se folosește eozina B, 30-45 secunde.

2. Embrioni de amfibieni

1. Îndepărtarea învelișului gelatinos manual sau chimic, după protocolul prezentat în capitolul 1, subcapitolul *Xenopus laevis*, secțiunea IV.
2. Fixare peste noapte, la temperatura camerei, în fixator Dent.
3. Albirea pigmentului cu 10% apă oxigenată, diluată în fixator Dent. Decolorarea poate dura 1-4 zile.
4. Spălare în tampon Tris salin, 15 minute.
5. Incubare peste noapte cu anticorpii primari, diluați în 95% ser fetal de vițel/5%DMSO. Se agită ușor.
6. Spălare de 5 ori în tampon Tris salin, o oră fiecare baie.
7. Incubare peste noapte cu anticorpii secundari, diluați ca și cei primari.
8. Spălare de 5 ori în tampon Tris salin, o oră fiecare baie.
9. Dezvoltarea complexului imun în funcție de markerul anticorpului secundar.
10. Deshidratare prin două băi de metanol, prima de 15 minute și a doua de 30 minute.
11. Clarificare în alcool benzilic : benzoat de benzil (1:2).

3. Embrioni de Drosophila

1. Îndepărtarea corionului prin tratamentul cu hipoclorit de sodiu, după protocolul prezentat în capitolul 1, subcapitolul *Drosophila melanogaster*, secțiunea II.
2. Fixare cu agitare, într-un amestec de 1:1, 4% formaldehidă în tampon fosfat salin : *n*-heptan (1 ml amestec într-un tub Eppendorf pentru mai puțini embrioni sau 10 ml într-un tub de centrifugă de 15 ml pentru câteva mii de embrioni). *Heptanul permeabilizează membrana vitelină ce înconjoară embrionul*. Fixarea variază între 5 minute și o oră, în funcție de antigen.
3. Se transferă embrionii cu o pipetă Pasteur într-un amestec de metanol : heptan (1:1), prerăcit la -70°C . Se agită și se congelează la -70°C câteva minute. *După acest tratament anvelopa vitelină va crăpa și embrionii cad la fundul tubului.*
4. Se colectează embrionii din fundul tubului cu o pipetă Pasteur și se transferă în alt tub. Se spală de două-trei ori cu metanol absolut. Embrionii pot fi stocați nedefiniți la -20°C . Unii antigeni sunt denaturați sau pierduți dacă embrionii sunt lăsați în metanol la temperatura camerei. Din acest motiv se recomandă spălarea rapidă a embrionilor devitelinizați și plasarea lor la -20°C .
5. Procesarea pentru imunohistochimie, după unul din protocoalele de mai sus.

Protocol experimental - imunocitochimie în microscopia electronică

S-au descris două metode imunohistochimice în microscopia electronică: (1) înainte de includere; (2) după includere, pe secțiuni întinse pe grile.

Imunohistochimia înainte de includere este folosită în cazul localizării receptorilor, a antigenelor de suprafață, sau a celor care pot fi solubilizate de agenții de deshidratare sau de mediile de includere. Este de asemenea utilă pentru studiile electrono-microscopice asupra țesuturilor mari și heterogene, de tipul creierului mamiferelor.

Pentru realizarea reacției imunohistochimice se taie la vibratom fragmente mici (20-câteva sute de μm) de țesut proaspăt sau fixat, după care se realizează o metodă indirectă, în care anticorpii secundari sunt cuplați cu peroxidază. La soluții se adaugă detergenți sau saponine pentru pătrunderea în țesut. Țesutul este apoi post-fixat și contrastat cu OsO_4 , deshidratat și inclus în rășini epoxidice.

Imunocitochimia pe grile se realizează după includerea fragmentelor de țesut în medii de includere. După secționarea la ultratom, secțiunile ultrafine se depun pe grile de nichel și se realizează imunocitochimia.

Se va prezenta protocolul experimental pentru imunocitochimia pe grile, folosit în laboratorul nostru.

1. Fixarea unor fragmente mici de țesut (1-4 mm) în 0,5% glutaraldehidă - 2% paraformaldehidă în tampon fosfat salin, 30-60 minute, la temperatura camerei. *Compoziția fixatorului poate varia în funcție de sensibilitatea antigenului. Pentru anumii antigeni este necesară reducerea concentrației de glutaraldehidă sau omiterea ei și fixarea în 4% formaldehidă în tampon fosfat salin, 1-4 ore.*
2. Spălare în tampon fosfat salin, 3 băi, câte 10 minute fiecare baie.
3. Reducerea grupărilor aldehidice libere prin incubarea 5 minute în 0,1 M glicină în tampon fosfat salin.
4. Spălare în 0,1 M tampon cacodilat de sodiu sau tampon fosfat salin.
5. Post-fixare, o oră, la temperatura camerei în 1-2% tetraoxid de osmiu. *Dacă țesutul va fi inclus într-un mediu care polimerizează în prezența radiațiilor ultraviolete, de tipul Lowicryl sau LR Gold, nu se post-fixează cu OsO_4 .*
6. Deshidratarea probelor și includere. Alegerea mediului de includere poate afecta imunoreacția. Deși se pot folosi toate mediile, rășinile epoxidice de tipul Epon sau Spurr pot reduce intensitatea reacției. Rășinile acrilice (LR White, LR Gold, Lowicryl) sunt mai hidrofile și dau rezultate mai bune. Se va prezenta metoda de includere în LR White. Cea de includere în Epon va fi descrisă în capitolul 6.

Includerea în LR White

Fragmentele de țesut sunt trecute prin următoarele băi:

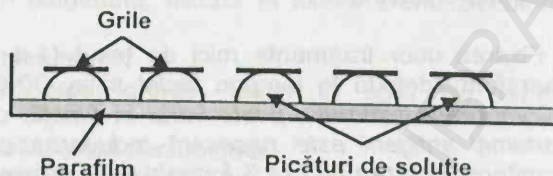
- 50% etanol, 30 minute.
- 75% etanol, 30 minute.
- LR White : 75% etanol (1:1), 1-2 ore. *LR White este foarte higroscopic și absoarbe rapid apa. Dacă amestecul LR White : 75% etanol (1:1) este tulbure, se crește concentrația de etanol până la 95%.*
- LR White : 75% etanol (2:1), 1-2 ore.
- LR White, 1-2 ore.
- LR White, peste noapte.
- Se plasează fragmentele de țesut în capsule de gelatină sau plastic, care se umplu cu LR White. *Se astupă capsulele cu dopuri, deoarece oxigenul va inhiba polimerizarea.*
- Polimerizare 24 de ore, la 50-55°C.

7. Secționarea blocurilor cu țesut la ultratom și întinderea pe grile de nichel. *Grilele de nichel se magnetizează și trebuie manipulate cu pense nemagnetice.*
8. Permeabilizarea incluzionantului pentru a permite pătrunderea reactivilor în probă. În acest scop grilele se așează cu fața în jos pe o picătură de soluție saturată de meta-periodat de potasiu, proaspăt preparat. Operația se realizează în cutii Petri pe fundul cărora se așează parafilm (Fig.140). *Dacă anticorpusul primar este față de un epitop ce conține zaharuri, expunerea trebuie să fie foarte scurtă, deoarece acestea sunt îndepărtate. Permeabilizarea incluzionantului depinde de tipul de rășină folosită*

și poate varia de la 30 minute pentru Epon până la mai puțin de 5 minute pentru LR White și LR Gold.

9. Spălare prin scufundarea grilelor de 5 ori în apă distilată deionizată.

Fig.140. Schema colorării imuno-
citochimice a grilelor în picătură.



10. Blocarea legării nespecifice prin incubarea grilelor 15 minute în 1% albumină serică bovină în tampon fosfat salin.
11. Spălare prin scufundarea grilelor de 5 ori în tampon fosfat salin.
12. Incubarea grilelor cu anticorpul primar diluat în tampon fosfat salin cu 1% albumină serică bovină, 1-2 ore la temperatura camerei sau peste noapte la 4°C. *Concentrația anticorpului primar trebuie să fie între 1-20 μg/ml. Dacă apare o colorație de fond nespecifică, anticorpul se diluează mai mult în tampon fosfat salin cu Tween-20.*
13. Spălare ca în etapa 11.
14. Incubarea grilelor cu proteina A sau proteina G cuplate cu aur coloidal sau cu un anticorp secundar biotilinat, 30 minute la temperatura camerei. *Proteinele cuplate cu aur coloidal se diluează în tampon fosfat salin, la care se adaugă 1% albumină serică bovină sau 0,01% polietilenglicol (GW 20.000).*
15. Spălare ca în etapa 11.
16. Spălarea grilelor cu jet de apă distilată deionizată, folosind o pisetă și uscare.
17. Colorarea grilelor, 10 minute, cu 2% acetat de uranil.
18. Spălare prin scufundarea fiecărei grile de 20 de ori în apă distilată deionizată, urmată de uscare.
19. Colorare, 5 minute, cu citrat de plumb.
20. Spălare ca în etapa 18.

III. METODE DE DETECTARE A PROTEINELOR RAPORTOARE

O proteină raportoare este considerată acea proteină a cărei exprimare este legată de o genă de interes și care poate fi vizualizată ca rezultat al propriei bioluminescențe, fluorescenței sau produsului de colorare.

Primele studii ale animalelor modificate genetic au fost realizate folosind gene raportoare de tipul CAT (cloramfenicol-acetiltransferaza) sau luciferazei, care permit detectarea exprimării genelor în omogenate celulare. Pe secțiuni de țesut detectarea acestor gene raportoare este dificilă. În ultimi ani genele raportoare preferate în studiile de biologia dezvoltării sunt cele care codifică β-galactozidaza, fosfataza alcalină placentară umană și GFP.

Luciferaza este o enzimă de 62 kDa prezentă la licurici (*Photinus pyralis*) care catalizează convertirea în prezența ATP, O₂ și Mg²⁺ a luciferinei în oxiluciferin, AMP, PP_i, CO₂ și lumină de culoare galbenă (560 nm). Este codificată de gena *luc*. Avantajul major al luciferazei este acela că ea poate fi utilizată pentru a detecta

niveluri foarte scăzute ale expresiei genice, deoarece spre deosebire de fluorescența altor molecule raportoare, bioluminiscența din reacția pe care o catalizează nu este asociată cu semnale nespecifice. Exprimarea luciferazei este măsurată de obicei prin adăugarea de luciferină și ATP la lizatele celulare, după care se măsoară lumina emisă cu un luminometru. Dezavantajul luciferazei este acela al dificultății de a furniza luciferină celulelor intacte (Spergel și al.,2001).

β -galactozidaza extrasă din *Escherichia coli* este o enzimă compusă din patru monomeri, fiecare cu o greutate moleculară de 465-kDa. Enzima este codificată de gena *lacZ*. Există trei tipuri de substraturi pentru detectarea β -galactozidazei: (1) X-gal, care determină un precipitat indigo (Fig.141, pentru varianta color vezi Planșa I8a-b); (2) Bluo-gal, care are o sensibilitate mai mare și formează un precipitat albastru închis. În plus, țesuturile se pot contrasta cu hematoxină-eozină; (3) gal de somon, în acest caz precipitatul este de culoare roz și mai difuz (Planșa I9).

Cel mai cunoscut substrat cromogenic este X-gal, care catalizează reacția a doi moli de substrat (5-bromo-4-clor-3-indolil- β -D-galactopiranozid), la doi moli de 5-bromo-clorindoxil, care este convertit ulterior în prezența oxigenului la un mol de produs de reacție albastru (5,5'-dibromo-4,4'-dicloroindigo) (Spergel și al.,2001).

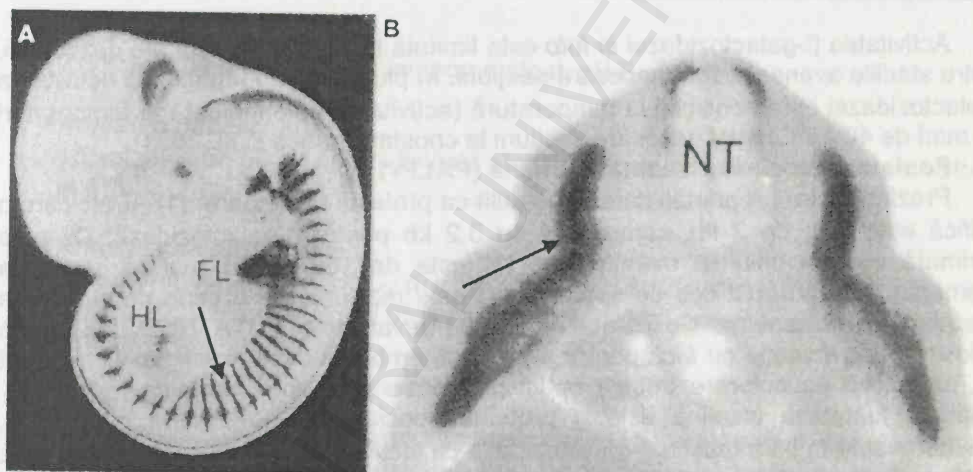


Fig.141. Detectarea transgenei *Myf-5-lacZ* într-un embrion de șoarece de 11 zile jumătate, prin colorarea β -galactozidazei (săgeți) *in toto* (A) și pe secțiuni (B). B-secțiune sagitală la nivelul capului.

La mamifere, detectarea activității *lacZ* este relativ simplă în embrionii întregi, până la 13 zile post împerechere. După acest stadiu, substratul nu mai poate penetra întreg embrionul. În plus, activitatea β -galactozidazei endogene, în special în oase, rinichi și creier crește. Colorarea de fond ca rezultat al activității enzimatice endogene poate fi ținută la minim prin realizarea reacției la pH 7,3, pH-ul optim pentru enzima bacteriană. β -galactozidaza endogenă, din lizozomi are pH-ul optim cuprins între 3-6.

Cel mai folosit fixator pentru β -galactozidază este glutaraldehida sau paraformaldehida. Formolul nu este recomandat deoarece conține urme de metanol. Toți fixatorii care au în compoziție solvenți organici inactivează β -galactozidaza. Din acest motiv, embrionii și țesuturile nu se pot include în parafină sau plastic. Embrionii pot fi observați *in toto* sau secționați la criostat.

Colorarea β -galactozidazei poate fi combinată cu imunocitochimia pentru a colocaliza diferiți antigeni. De exemplu, se poate evidenția exprimarea β -galactozidazei cu X-gal (colorație albastră) urmată de imunohistochimie în care anticorpii secundari cuplați cu peroxidază este pus în evidență în prezența cromogenului DAB (colorație maro). De asemenea, se poate realiza evidențierea β -galactozidazei urmată de hibridizare *in situ*. (Fig.142).

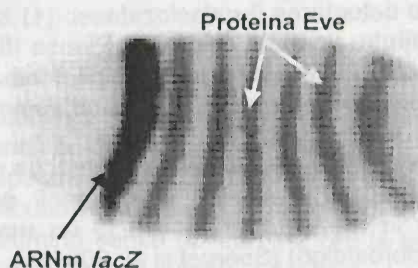


Fig.142. Embrion de *Drosophila* în care s-a detectat ARNm *lacZ* prin hibridizare *in situ* și proteina Eve cu anticorpi marcați cu peroxidază. Atât ARNm cât și proteina apar sub formă de benzi transversale.

Activitatea β -galactozidazei *in toto* este limitată la stadiile timpurii ale dezvoltării. Pentru stadiile avansate sunt necesare secțiuni. În plus, datorită faptului că activitatea β -galactozidazei este sensibilă la temperatură (activitatea este inhibată la temperaturi mai mari de 40-42°C) sunt necesare secțiuni la criostat (Franco și al.,2001).

Fosfataza alcalină placentară umană (PALP-1¹²)

Prezintă patru proprietăți care o fac utilă ca proteină raportoare: (1) ADNc care o codifică este mic, de 2 kb, comparativ cu 3,2 kb pentru β -galactozidază; (2) este exprimată ușor în celulele mamiferelor; (3) este de 100 de ori mai rezistentă la tratamentul termic decât cea de șoarece; (4) este rezistentă la o serie de substanțe care inhibă alte izoenzyme ale fosfatazei alcaline (levamisole, EDTA, HgCl₂); (5) poate fi folosită în combinație cu *lacZ* pentru a produce embrioni dublu transgenici. În acest caz, protocolul de colorare trebuie optimizat pentru cele două proteine raportoare. Deoarece fosfataza alcalină este o proteină asociată de membrana plasmatică, detectarea activității va masca β -galactozidaza cu localizare intracelulară. În acest caz se folosește forma *lacZ* cu localizare nucleară. Pentru colorarea dublă se incubează inițial cu substratul pentru β -galactozidază și apoi cu cel pentru fosfataza alcalină, deoarece tratamentul termic inactivează β -galactozidaza.

Protocol experimental de evidențiere a β -galactozidazei in toto la șoarece

1. Fixarea embrionilor în 4% paraformaldehidă. Durata fixării depinde de dimensiunea probei: 10-15 minute pentru embrionii post-implanționali timpurii și 15-30 minute pentru embrionii de până la 13 zile post-împerechere. Înaintea fixării, se îndepărtează învelișurile extraembrionare. După fixare, pentru a facilita penetrarea, embrionii de 13 zile sau mai avansați se secționează sagital cu o lamă de ras. În cazul embrionilor mai mari de 15 zile și până la sfârșitul gestației se

¹²Placental alkaline phosphatase

recomandă perfuzarea cu fixator a femelei gestante. Când se examinează mai mulți embrioni odată se plasează individual în plăcuțe de cultură cu 24 de godeuri și se aspiră soluția fixatoare cu o pipetă Pasteur.

2. Spălarea embrionilor în tampon β -galactozidază, trei băi, a câte 15-30 minute fiecare baie, la temperatura camerei.
3. Incubare cu substratul pentru β -galactozidază. *Timpul de colorare depinde de dimensiunea probei și nivelul activității β -galactozidazei. Probele mici se incubează la 37°C 1-3 ore, în timp ce embrionii mai avansați sunt menținuți 4-5 ore sau mai mult la 37°C, protejați de lumină. Pentru incubările mai lungi este important să se adauge la soluția de colorare tampon Tris (pH 7,3).*
4. După colorare, embrionii pot fi observați *in toto* sau pot fi incluși în parafină pentru a observa exprimarea *lacZ* la nivel celular. Când secțiunile sunt observate la microscopul cu câmp întunecat colorarea *lacZ* apare roz și contrastează cu țesuturile înconjurătoare.

IV. MEDII ȘI SOLUȚII

■ 2% acetat de uranil

2 g acetat de uranil, 100 ml tampon maleat. pH 6

■ Amestec glicerol-apă

1,2 ml glicerol; 59 ml apă bidistilată sterilă. Filtrare prin filtru de 0,22 μ m. Stocare la 4°C.

■ Amestec de hibridizare

50% formamidă; 1,3X SSC, pH 5; 5 mM EDTA; 25 mg/ml ARNt drojdie; 0,2% Tween-20; 0,5% CHAPS; 0,05% heparină; 50 μ g/ml spermă de hering denaturată termic.

■ 2% aminoalchilsilan

2% aminoalchilsilan (3-aminopropiltriethoxisilan, Sigma) sau 3(triethoxi-silil)propilamină (Merck), în acetonă uscată, puritate 99,5%. Se stochează la 4°C, într-un recipient închis, ce conține sulfat de calciu anhidru. Se lasă la temperatura camerei înainte de deschidere.

■ Amestec hidroliză alcalină

Se amestecă volume egale de 80 mM NaHCO_3 și 120 mM Na_2CO_3 , pH 10,2. Se porționează și se stochează la -20°C.

■ Amidol

Se prepară extemporaneu soluția prin dizolvarea a 1,13 g Amidol în 200 ml apă bidistilată. Se adaugă 4,5 g Na_2SO_3 și se aduce la volum final de 250 ml cu apă bidistilată. Se filtrează soluția prin hârtie de filtru și se adaugă 2 ml de 10% KBr.

■ Citrat de plumb

Se adaugă într-un balon cotat de 50 ml 1,33 g nitrat de plumb, 1,76 g citrat trisodic $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 30 ml apă distilată deionizată. Se agită viguros un minut. Se lasă

în repaus 30 minute, agitându-se ocazional. Se adaugă 8 ml 1N NaOH. Se aduce soluția la 50 ml cu apă distilată deionizată și se amestecă prin inversarea balonului cotate. Soluția este stabilă până la 6 luni. Turbiditatea poate fi îndepărtată prin centrifugare.

■ **Fenol**

Se dizolvă fenolul (molecular biology grade; Life Technologies) la 65°C într-o hotă și se echilibrează cu 0,1 M Tris-HCl, pH 7. Se adaugă câteva cristale de 8-hidroxichinolină, care vor colora soluția în galben. Se stochează la 4°C, protejată de lumină. Când soluția devine portocalie se aruncă. *Fenolul este coroziv și poate cauza arsuri severe.*

■ **Fixator autoradiografie**

30% tiosulfat de sodiu în apă bidistilată.

■ **Fixator Bouin**

75 ml acid picric saturat; 25 ml formol; 5 ml acid acetic glacial.

■ **Fixator Dent**

80 ml metanol; 20 ml DMSO.

■ **Formamidă deionizată**

Se adaugă 5 g Biorad AG 501-X8 mixed-bed resin (20-50 mesh) la 100 ml formamidă. Se agită cu agitator magnetic o oră. Se filtrează prin filtru Whatman #1 se alicotează și se stochează la -20°C.

■ **Gelvatol**

Se amestecă 2,6 g gelvatol 20-30 (Monsanto) cu 6 g glicerol. Se adaugă 6 ml apă distilată și se lasă în repaus câteva ore, la temperatura camerei. Se adaugă 12 ml 0,2 M Tris pH 8,5 și se încălzește 10 minute la 50°C, cu agitare ocazională, până se dizolvă gelvatolul. Se centrifughează la 5000 g, 15 minute. La supernatant se adaugă 2,5% DABCO (1,4-diazobisciclo-[2.2.2]-octan) pentru reducerea fluorescenței. Se porționează și se păstrează în recipiente bine închise, nedefinite, la -20°C.

■ **0,1 M glicină**

750 mg glicină; 100 ml tampon fosfat salin, pH 7,4

■ **LR White**

Se stochează la 4°C. În momentul utilizării, înaintea deschiderii sticlei, se aduce la temperatura camerei. Este stabil un an.

■ **Nuclear Fast Red**

Soluție stoc: se dizolvă în apă bidistilată 0,1% Nuclear-fast-red și 5% sulfat de aluminiu. Se filtrează și se stochează la 4°C.

Soluție de lucru: Se diluează soluția stoc cu apă distilată în raport de 1 : 5. Se stochează la 4°C. Înainte de folosire se aduce la temperatura camerei și se filtrează.

■ **4% paraformaldehidă**

Se dizolvă 4% paraformaldehidă în tampon fosfat salin steril, la 60-70°C, cu agitare (dizolvarea durează ~o oră). Se răcește la temperatura camerei și se verifică pH-ul înainte de folosire. *Vaporii de formaldehidă sunt foarte toxici. Se recomandă manipularea soluției în hotă.*

■ **Pepsină**

Soluție stoc: 10% pepsină (800-2500 U/mg) în apă bidistilată sterilă. Se alicotează și se stochează la -20°C. Soluția stoc este stabilă cel puțin un an.

Soluție de lucru: 0,1% pepsină în 0,01 N HCl (=1 mg). Se incubează soluția la 37°C, 45 de minute înainte de folosire și se utilizează în decursul a trei ore de la preparare.

■ **Soluție autometalografie**

Soluții stoc: 25% gumă arabică, în apă distilată deionizată

2M tampon citrat: 6,37 g acid citric, 5,87 g citrat de sodiu, 25 ml apă distilată deionizată

Agent reducător: 0,85 g hidrochinonă, 15 ml apă distilată deionizată

Lactat de argint: 0,11 g în 15 ml apă distilată deionizată

Toate soluțiile, cu excepția gumei arabice se prepară extemporaneu. Hidrochinona și lactatul de argint se protejează de lumină prin acoperirea cu folie de aluminiu.

Soluție de lucru: 60 ml gumă arabică; 10 ml tampon citrat; 15 ml hidrochinonă; 15 ml lactat de argint. Se incubează 5-30 minute la întuneric.

■ **SSC**

Soluție stoc 20X: 3M NaCl; 0,3 M citrat de sodiu (pH 7,2).

■ **Substrat fosfatază alcalină**

Soluții stoc: tampon fosfatază alcalină: 0,1 M Tris-HCl, pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 0,1% Tween-20; 1 mM levamisole. Se prepară extemporaneu

NBT: 75 mg/ml în 70% dimetilformamidă

BCIP: 50 mg/ml în 100% dimetilformamidă

Soluție de lucru: 10 ml tampon fosfatază alcalină; 45 μl NBT; 35 μl BCIP.

■ **Substrat β-galactozidază**

Soluții stoc: X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranozid) 50 mg/ml în dimetilformamidă. Se stochează la -20°C, protejată de lumină. Se folosesc numai recipiente și pipete de sticlă.

Tampon de colorare: 0,1 M tampon fosfat (pH 7,3); 2 mM MgCl₂; 0,01% deoxicolat de sodiu; 0,02% Nonidet P-40; 5 mM fericianură de potasiu; 5 mM ferocianură de potasiu.

Soluție de lucru: Se diluează soluția stoc X-gal în tamponul de colorare, la o concentrație finală de 1 mg/ml. Dacă colorarea este realizată mai mult de o oră, se recomandă adăugarea de tampon Tris (pH 7,3) la soluția colorantă pentru a da o concentrație finală de 20 mM. După folosire soluția de colorare poate fi filtrată și refolosită câteva luni. Se stochează la 4°C, protejată de lumină.

■ **Substrat peroxidază**

0,03 g DAB; 0,03 g NiCl₂; 50 ml tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20.

■ **RNaza A**

10 mg/ml RNază A în 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) cu 15 mM NaCl. Se fierbe 5 minute la 100°C și se răcește la temperatura camerei. Se stochează în porții la -20°C.

■ **0,1 M tampon cacodilat**

2,14 g acid cacodilic.3H₂O sare de sodiu; 100 ml apă distilată deionizată. Se ajustează pH-ul la 7,4 cu HCl. *Cacodilatul de sodiu este toxic. Se manipulează în hotă cu mănuși.*

■ **Tampon fosfat salin**

Soluție stoc 10X: 81,8 g NaCl; 2 g KCl; 11,6 g Na₂HPO₄·H₂O; 2 g KH₂PO₄; 1000 ml apă bidistilată.

■ **Tampon fosfat salin – Tween-20**

Tampon fosfat salin cu 0,1% Tween-20.

■ **0,1 M tampon maleat**

1,16 g acid maleic; 3,5 g zaharoză; 100 ml apă distilată deionizată. pH 6,5.

■ **Tampon de permeabilizare - PBSMT**

2% lapte praf degresat instant; 0,5% Triton X-100; Ambele componente adăugate în tampon fosfat salin.

■ **Tampon RNază**

Soluție stoc de 5X concentrată: 50 mM Tris-HCl, pH-8; 25 mM EDTA; 2,5 M NaCl.

■ **Tampon Tris salin**

Soluție stoc 10X: 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 25 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5; 1 ml Tween-20; 100 ml apă bidistilată.

Soluție de lucru: 10 ml soluție stoc; 90 ml apă bidistilată.

■ **Tetraoxid de osmiu**

Soluție stoc 4%: 1 g OsO₄; 25 ml apă deionizată. Se curăță fiola de OsO₄, se crestează cu creionul diamant și se plasează într-o sticlă brună cu dop rodat. Se adaugă apă și cu o baghetă de sticlă se sparge fiola. Soluția este stabilă dacă este păstrată la frigider, protejată de lumină. *Soluția stoc nu trebuie plasată în contact cu alte substanțe, deoarece pot scăpa vaporii de osmiu din sticlă. Osmiul este extrem de toxic și trebuie manipulat cu mănuși, la hotă.*

■ **Tris - EDTA**

Soluție stoc: 10 mM Tris-HCl (pH 8); 1 mM EDTA; pH 8

CAPITOLUL

6

METODE DE IDENTIFICARE

A APOPTOZEI

Dezvoltarea embrionară este un proces dinamic, care cuprinde diviziuni celulare, migrări, diferențiere și apoptoză. Într-un embrion, o celulă apoptotică este înconjurată adesea de multe celule care se divid sau se diferențiază, aspect care face identificarea dificilă. În plus, foarte rar un grup de celule suferă apoptoza în masă, deoarece debutul apoptozei nu este de obicei sincron. În funcție de mecanismele care le guvernează și fenotipul celular au fost descrise patru forme de moarte celulară: (1) apoptoza; (2) oncoza; (3) necroza; (4) autofagia (Fig.143) (Majno și Joris, 1995).

Apoptoza definește o situație în care o celulă care moare pierde aderența cu celulele vecine sau cu matricea extracelulară, se rotunjește și se condensează. Cromatina se condensează de-a lungul membranei nucleare, în timp ce citoplasma se colorează intens în microscopia optică și electronică. După înmugurirea celulei, în final, apar corpii apoptotici care sunt fagocitați. Mitocondriile apar intacte dar sunt depolarizate și permit ieșirea citocromului *c* și a altor componente. Aspectul caracteristic al citoplasmei și nucleului rezultă din activarea caspazelor pre-existente, ce clivează componentele importante ale citoscheletului și matrixului nuclear. Fagocitoza de către fagocite sau celulele vecine are loc rapid și celulele apoptotice dispar adesea în 1-2 ore (Pentru descrierea amănunțită a apoptozei vezi Zărnescu O., Biologia dezvoltării, partea I)

Oncoza¹ desemnează orice moarte celulară caracterizată prin umflarea pronunțată a celulei. Aspectele caracteristice oncozei sunt următoarele: (1) este o formă de moarte celulară acompaniată de umflarea celulei și a organitelor, înmugurirea și creșterea permeabilității membranare; (2) mecanismul său se bazează pe alterarea pompelor ionice din plasmalemă; (3) este cauzată de ischemie și probabil de agenți toxici care interferează cu generarea de ATP sau creșterea permeabilității membranei plasmactice; (4) evoluează în 24 de ore spre necroză; (5) este acompaniată de obicei de karioliză; (6) fragmentarea ADN are loc într-o manieră nespecifică.

Necroza se referă la modificările ireversibile ale nucleului (karioliză, picnoză) și citoplasmei (condensare, eozinofilie intensă, pierderea structurii, fragmentare) care apar după ce celula a murit.

¹Umflare, grec. Termen introdus în 1910 de F. Von Recklinghausen pe baza observațiilor asupra osteocitelor în osteomalacie.

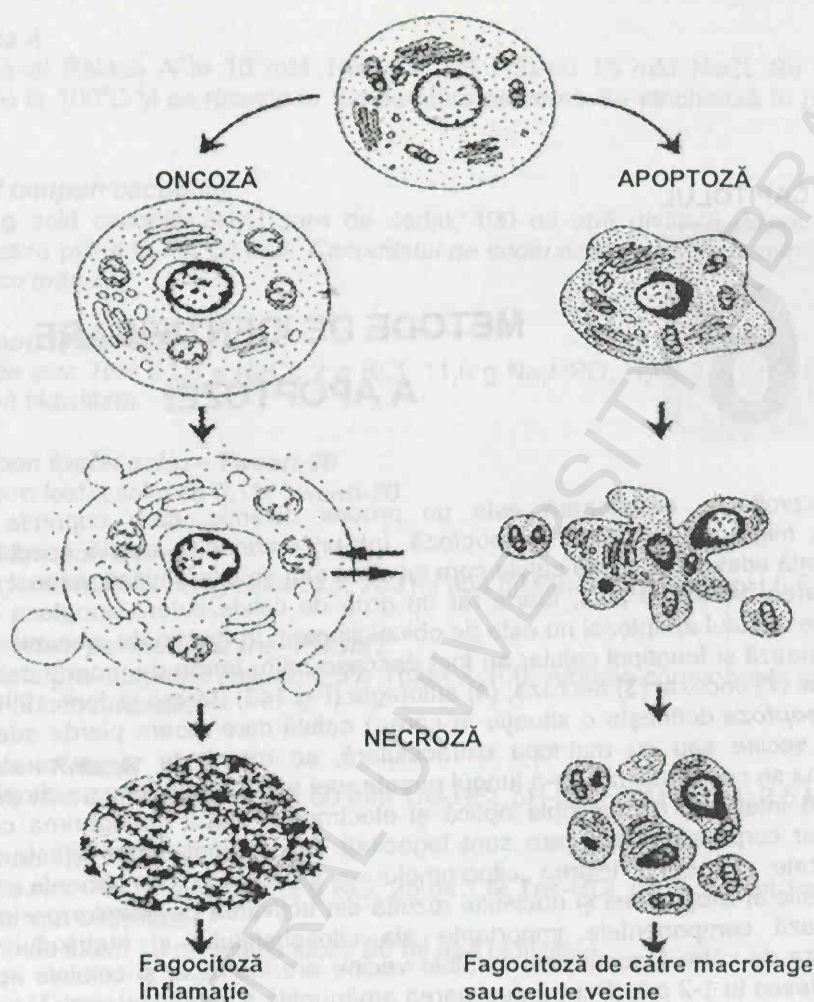


Fig.143. Reprezentarea schematică a apoptozei, oncozei și necrozei. (După Majno și Joris, 1995).

Autofagia sau **moartea celulară lizozomală** este caracteristică celulelor mari, postmitotice ce conțin citoplasmă masivă, de tipul țesuturilor glandulare (glandele insectelor la metamorfoză și epiteliul mamar), mușchilor și neuronilor diferențiați. În aceste celule, distrugerea ADN nu este imperativă. Pe de altă parte, citoplasma acestor celule este voluminoasă și nu poate fi preluată simplu de fagocite. Deși apar multe din modificările caracteristice apoptozei, ele sunt întârziate și celula suferă alterări substanțiale înaintea acestui stadiu. Caracteristica cea mai evidentă este apariția vacuolelor autofagice mari. Acestea apar în timp ce celula rămâne funcțională și în cazul mușchilor pot reține potențialul de repaus. În mușchi are loc eroziunea miofilamentelor, cel mai probabil în proteazomi. În final, când aproximativ 80% din citoplasmă a fost distrusă, condensarea citoplasmei și a cromatinei devine evidentă,

electroforeza evidențiază apariția fragmentelor ADN și resturile celulare sunt fagocitate ca în apoptoza clasică.

Unele din cele mai valoroase tehnici pentru studierea apoptozei în cursul maturării sistemului imun sau în culturi de celule, de tipul citometriei în flux sunt foarte rar aplicate la embrioni. Numărul mic de celule și importanța distribuției temporale și spațiale a morții celulare necesită folosirea în cazul embrionilor a imunohistochimiei și hibridizării *in situ*.

Dinamica embrionului reprezintă o situație deosebită pentru analiza morții celulare. Populațiile celulare se modifică constant și celulele sunt în diferite stadii ale ciclului celular. Astfel, multe din metodele utilizate în determinarea și analiza apoptozei în culturile de celule nu sunt folositoare sau sunt dificil de interpretat pe embrioni. Scopul studierii morții celulare în embrion este acela de a identifica apoptozele celulare în contextul lor spațial și temporal. Din acest motiv un număr de metode folosesc examinarea *in situ* a embrionilor întregi sau a secțiunilor embrionare.

S-au descris următoarele tehnici de studiere a apoptozei embrionare: (1) analiza morfologiei celulare; (2) colorare vitală; (3) detectarea fragmentării ADN; (4) detectarea fosfatidilserinei expuse; (5) detectarea lizozomilor și a vacuolelor autofagice; (6) detectarea activității caspazei-3.

I. DETECTAREA APOPTOZEI PE BAZA MORFOLOGIEI CELULARE

Datorită caracterului tranzitoriu și restricției spațiale a apoptozei în embrion una din cele mai folositoare metode este microscopia.

A. Detectarea apoptozei prin microscopie optică

Detectarea celulelor apoptotice se poate realiza în microscopia optică prin colorarea cu Hematoxilină-eozină (Fig.144). În acest caz, citoplasma și nucleul celulelor moarte apar mai intens colorate decât în celulele viabile. Sensibilitatea metodei este relativ scăzută și poate fi folosită doar pe secțiuni.

Protocol experimental

1. Deparafinarea secțiunilor prin trei băi succesive de xilen și hidratarea lor prin trei băi succesive de alcool etilic de concentrație descrescătoare (100%, 95%, 70%), câte două minute fiecare baie.
2. Spălare 5 minute cu apă distilată.
3. Colorare 5-10 minute, cu hematoxilină Carazzi.
4. Spălare cu apă de robinet, 3 băi a câte două minute fiecare baie.
5. Colorare 5-10 minute cu 1% eozină apoasă.
6. Spălare apă distilată, 3 băi a câte 3 minute fiecare baie.
7. Deshidratare prin trei băi succesive de alcool etilic, de concentrații crescătoare (70%, 95%, 100%), 2 minute fiecare baie, clarificare prin trei băi de xilen, 2 minute fiecare baie și montare în balsam de Canada.

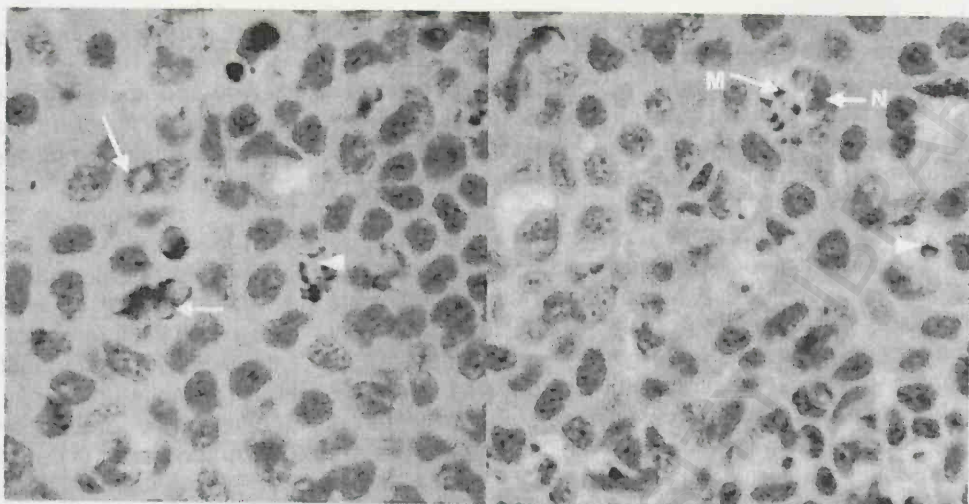


Fig.144. Celule apoptotice (săgeți) și corpi apoptotici (cap de săgeată) în coada mormolocului de amfibian. M-macrofag în citoplasma căruia se remarcă mai mulți corpi apoptotici. N-nucleul macrofagului. Colorație Hematoxilină & eozină.

B. Detectarea apoptozei prin microscopie electronică

În microscopia electronică, celulele apoptotice sunt mai greu de distins de celule la începutul metafazei sau de o celulă mică, bogată în proteine. Deoarece embrionii conțin mai multă apă decât țesuturile adulte este necesară o fixare adecvată.

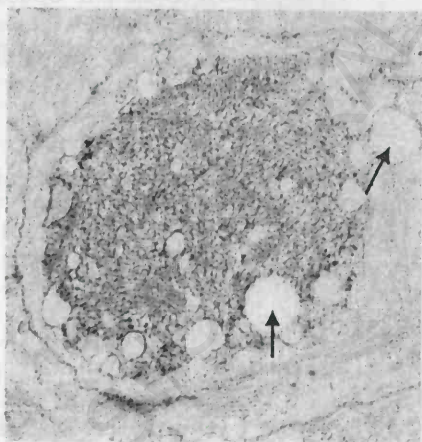


Fig.145. Imagine electronomicroscopică a unui cardiomiocit apoptotic. Se remarcă vacuole mari în celulă (săgeți). (După Rothenberg și al., 2002).

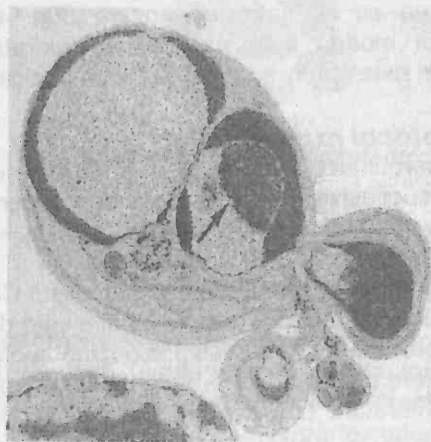


Fig.146. Imagine electronomicroscopică a unei celule apoptotice. Săgeata indică masa formată din componenta fibrilară a nucleolului. Bara=2μm. (După Kerr și al.,1994).

Pentru ca o celulă să fie considerată apoptotică trebuie să îndeplinească următoarele criterii în microscopia electronică: (1) la începutul apoptozei, tipul celular poate fi identificat prin prezența aspectelor caracteristice, de tipul miofibrilelor în cazul cardiomiocitelor (Fig.145) sau fibrelor musculare striate; (2) membrană plasmatică intactă, chiar în stadiile târzii ale dezintegrării celulare; (3) nucleu și citoplasmă electrono-dense; (4) înmugurirea celulei (Fig.146); (5) vacuole mari, clare; (6) dezorganizarea citoplasmei; (7) fragmentare nucleară. Nucleul celulei apoptotice este "marginalizat". În această situație, cromatina formează mase dense așezate pe anvelopa nucleară; (8) în stadiile avansate apar corpii apoptotici care frecvent sunt fagocitați de celulele vecine, cum este cazul cardiomiocitelor embrionare, celulelor musculare netede vasculare sau de macrofagele specializate (Fig.147).

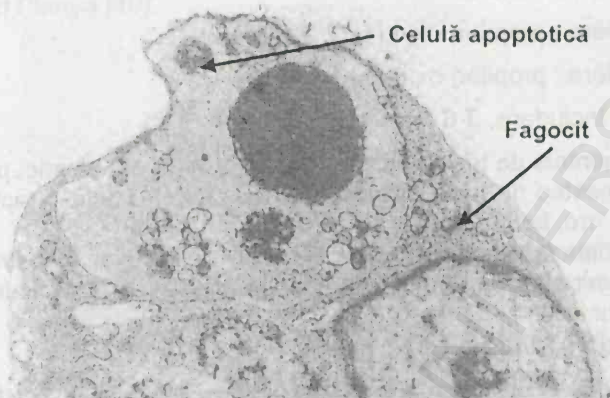


Fig.147. Imagine electronomicroscopică a unei celule apoptotice fagocitată de o celulă vecină (După Sanders și Wride, 1995).

Țesuturile incluse în rășini sintetice pot fi secționare la 1 μm și colorate cu Albastru de toluidină. Metoda are avantajul că poate identifica zonele cu apoptoză, care pot fi secționate ulterior pentru microscopia electronică. Dezavantajele metodei cuprind: (1) nu se pot detecta corpii apoptotici mici; (2) celule sănătoase ce conțin granule intracelulare dense, pot fi confundate cu celule apoptotice sau fragmente celulare. Au existat cazuri în care celule sănătoase cu nucleu heterocromatici de tipul limfocitelor sau a celor care sufereau mitoză au fost interpretate greșit ca celule apoptotice.

Unul din cele mai mari dezavantaje ale microscopiei electronice este acela că permite observarea unei regiuni embrionare foarte mici. În plus, procesarea țesuturilor pentru microscopia electronică necesită expunerea celulelor la solvenți organici. În plus, mediile de includere (rășini sintetice) polimerizează la temperaturi ridicate și sunt toxice. Procesarea poate distruge antigenele sau enzimele folosite pentru identificarea celulelor.

Protocol experimental

1. Fixare în 2,5% glutaraldehidă în tampon fosfat salin, la 4°C, câteva zile.
2. Postfixare în 1% tetraoxid de osmiu în tampon fosfat salin, la 4°C, 1 oră.
3. Includere în rășini sintetice.

Includerea în rășini epoxidice (Epon 812)

Mediile epoxidice se infiltrează rapid în țesuturi și determină o extracție minimă a componentelor celulare. Blocurile polimerizate pot fi secționate și colorate ușor și sunt relativ stabile la fluxul de electroni.

Fragmentele de țesut sunt trecute prin următoarele băi:

- 50% etanol, 15 minute.
- 75% etanol, 15 minute.
- 95% etanol, 15 minute.
- Două băi de etanol absolut, 15 minute fiecare baie.
- 100% propilen oxid, 15 minute.
- 100% propilen oxid, 30 minute.
- Amestec de includere : propilen oxid (1:1), 1-2 ore.
- Amestec de includere : propilen oxid (2:1), 1-2 ore.
- 100% amestec de includere, 3-6 ore.
- Se transferă fragmentele de țesut în capsule de gelatină sau plastic, peste care se toarnă amestec de includere. Se polimerizează peste noapte la 45°C și încă 24 de ore, la 60°C.

5. Se realizează secțiuni semifine la ultramicrotom, care sunt colorate cu Albastru de toluidină și observate în microscopia optică. Acestea furnizează o vizualizare excelentă a apoptozei în țesut.

Colorarea cu Albastru de toluidină O

- Se transferă secțiunile semifine secționate la ultratom, pe o lamă de sticlă, într-o picătură mare de apă distilată.
 - Se încălzește lama la 60°C, până ce toată apa s-a evaporat.
 - Se acoperă secțiunile cu soluție de Albastru de toluidină O.
 - În momentul în care marginile picăturii de colorant încep să capete culoarea auriu metalic (15-30 secunde), se îndepărtează rapid lama de pe platina încinsă și se înclină deasupra unui vas. Cu o pipetă se spală lama cu apă distilată, jetul de apă fiind deasupra secțiunilor.
 - Se șterge lama pe spate și în jurul secțiunilor și se așează pe plita încinsă până la uscarea totală. Se observă la microscopul optic.
6. Din zonele selectate se realizează secțiuni fine, care se colectează pe grile de cupru și se colorează 15 minute cu acetat de uranil și 10 minute cu citrat de plumb. Secțiunile sunt examinate la microscopul electronic.

II. DETECTAREA APOPTOZEI PRIN COLORARE VITALĂ

Modificările celulare ce conduc la expunerea fosfatidilserinei pe fața externă a membranei plasmactice sunt reflectate de o creștere modestă a permeabilității celulelor apoptotice, aspect care permite folosirea coloranților vitali pentru identificarea apoptozei. Coloranții vitali au fost folosiți pe embrionii de *Drosophila*, păsări și mamifere. Metoda este rapidă și permite examinarea tridimensională a morții celulare.

Dezavantajul este datorat faptului că rezultatele sunt considerate concludente doar dacă embrionul rămâne viu. În momentul în care acesta moare numărul de celule apoptotice crește. Cu toate acestea, dacă se controlează foarte bine timpul și temperatura, metoda este folositoare pentru detectarea apoptozei embrionare.

Se folosesc trei coloranți vitali: (1) Albastrul de Nile; (2) Acridin orange; (3) LysoTracker Red.

A. Albastru de Nile

Colorantul se acumulează în compartimentele acide ale celulelor, de tipul lizozomilor. Pentru observarea apoptozei în straturile profunde, embrionul poate fi congelat după colorare și secționat pentru a fi observat la microscop. Celulele moarte sau în curs de apoptoză se colorează în albastru închis (Fig.148, pentru varianta color vezi Planșa I10).

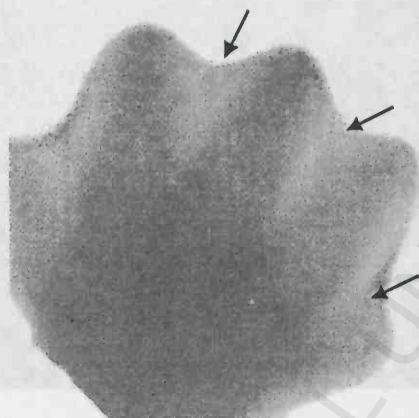


Fig.148. Zone de apoptoză interdigitale marcate cu Albastru de Nile (săgeți), în mugurii membrilor embrionilor de găină,

Protocol experimental

Se folosesc embrioni de găină la 6-7 zile de incubare.

1. Se realizează o fereastră în ou prin una din metodele prezentate în capitolul 1, subcapitolul *Gallus domestica*, secțiunea IIA.
2. Cu ajutorul pensei se prinde embrionul la nivelul gâtului, se scoate din ou și se plasează în soluție Tyrode, preîncălzită la 37°C.
3. Se incubează embrionii 20-30 minute, în 0,01% Albastru de Nile în soluție Tyrode, la 37°C.
4. Se îndepărtează colorantul prin spălare cu soluție Tyrode și se observă la stereomicroscop. Zonele de apoptoză sunt identificate prin prezența a numeroase granule de culoare albastră.

B. Acridin orange

Acridin orange (AO) este un colorant cationic, care se poate intercala în ADN sau ARN. El se poate asocia și electrostatic. Colorantul emite fluorescență verde (525 nm), când este asociat cu ADN și roșie când este asociat cu ARN (650 nm). Este puțin permeabil pentru celule și nu poate colora cromatina condensată. Metoda este eficientă pentru embrionii mici sau cei aflați la începutul dezvoltării, deoarece penetrarea colorantului poate fi o problemă (Graham, 1999). Celulele normale nu

preiau acest colorant, însă corpii apoptotici, bogați în cromatină se colorează intens în verde luminos (Fig.149). Colorarea cu acridin orange are avantajul că este rapidă, ieftină și ușor de realizat. Pe de altă parte, prezintă următoarele dezavantaje: (1) deoarece colorantul este utilizat vital și nu poate fi fixat, colorarea este tranzitorie și embrionii nu pot fi procesați pentru alte tehnici, de tipul imunohistochimiei; (2) embrionii trebuie procesați rapid și vizualizați imediat, în cel mult o oră de la colorare, deoarece țesuturile mor și colorarea intensă a corpurilor apoptotici este pierdută; (3) deși semnalul este mai intens atunci când observarea se face cu filtre pentru fluoresceină, în această iluminare apar și celulele necrotice; (4) deoarece nu există o etapă de permeabilizare, celulele apoptotice localizate în profunzimea embrionului nu sunt detectate. Pentru accesibilitatea colorantului se poate secționa embrionul înaintea colorării

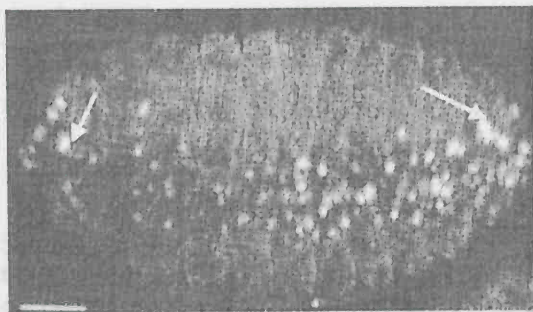


Fig.149. Celule apoptotice colorate cu acridin orange (săgeți) în embrionul de *Drosophila*. Bara=19 μm .

Protocol experimental

1. Disecarea embrionilor de găină în stadiul 10-11 și plasarea lor în vase Peri cu tampon fosfat salin.
2. Incubare 15 minute, în 5 $\mu\text{g/ml}$ Acridin orange, la 37°C.
3. Spălare, cu agitare în tampon fosfat salin, două băi a câte 1 minut fiecare baie.
4. Montare în tampon fosfat salin și observare la microscopul de fluorescență, cu filtre pentru rodamină.

C. LysoTracker Red (LTR)

Acționează într-un mod similar cu Albastrul de Nile prin acumularea în compartimentele intracelulare acide și în regiunile unde există o cantitate mare de activitate fagolizozomală, rezultată din fagocitarea corpurilor apoptotici de către celulele vecine. LTR este un colorant cu fluorescență roșie, care are un maxim de excitație la 568 nm și poate fi detectat cu filtre standard pentru rodamină. LTR poate fi fixat cu aldehide și penetrează ușor în țesuturi. Colorantul reține fluorescența în țesuturile deshidratate în metanol și clarificate în alcool benzilic și benzoat de benzil. Fluorescența este foarte puternică și rezistentă la fotodecolorare (Watanabe și al.,2002). Aceste avantaje permit folosirea lui în microscopia confocală scanning pentru a evidenția o imagine tridimensională a morții celulare în embrion (Fig.150).

Dificultățile tehnice ale LTR pot fi evitate prin monitorizarea corectă a colorării. Astfel, colorarea trebuie realizată la 37°C, într-un mediu de cultură ce conține ser pentru a menține viabilitatea. Pătrunderea colorantului în țesut este crucială pentru vizualizarea regiunilor apoptotice. Fixarea trebuie realizată în 4% paraformaldehidă sau 1% glutaraldehidă. Fixarea cu paraformaldehidă se realizează la 4°C iar cea cu

glutaraldehidă la temperatura camerei. Glutaraldehida are avantajul unei fixări excelente, însă dezavantajul major este cel al creșterii autofluorescenței nespecifice, când se utilizează excitația cu laser-488. Prin folosirea laserilor-568, pentru excitarea LTR se poate evita autofluorescența. Dezavantajele LTR cuprind: (1) necesită echipamente confocale scumpe; (2) poate colora regiuni acide fără apoptoză, de tipul nucleolului din ovocite. Din acest motiv, metoda nu este recomandată pentru celule care au în mod normal compartimente acide (macrofage și ovocite).

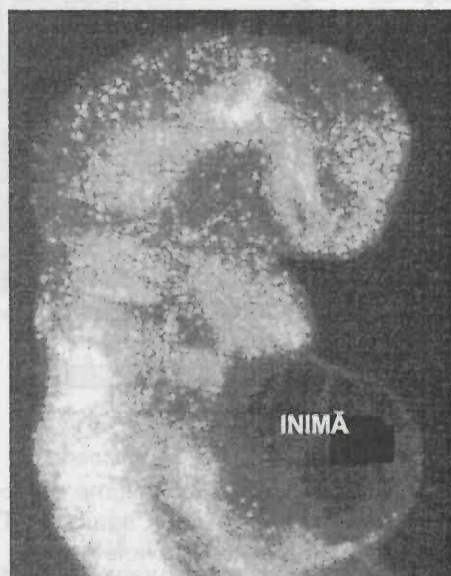


Fig.150. Embrion de șoarece *in toto*, cultivat 24 de ore în prezență de 250 μ M hidroxiuree și colorat cu LTR. Se remarcă o apoptoză masivă cu excepția inimii. (După Watanabe și al.,2002).

III. DETECTAREA FRAGMENTĂRII ADN

Se poate realiza prin trei metode: (1) electroforeza ADN; (2) metoda TUNEL; (3) metoda „comet”.

A. Electroforeza

Una din cele mai folosite metode pentru detectarea fragmentării ADN este electroforeza în gel de agaroză. Apoptoza este corelată cu fragmentarea internucleozomală a ADN. Cu toate acestea, nu toate celulele apoptotice au aceste caracteristici. În plus, unele celule oncotice prezintă acest aspect. Specificitatea electroforezei pentru detectarea celulelor apoptotice este mai scăzută decât s-a afirmat inițial.

Extracțele nucleare din celulele apoptotice prezintă un aspect de scară (ADN „ladder”) după electroforeza în gel de agaroză, fiecare bandă fiind separată prin aproximativ 200 pb (Fig.151). Metoda este foarte potrivită pentru culturile celulare, însă nu este practică pentru studierea apoptozei în majoritatea embrionilor. Ea poate fi folosită pentru a examina moartea celulară în cursul metamorfozei la insecte și amfibieni, când un întreg țesut sau organ suferă apoptoza, în mod mai mult sau mai puțin sincron. Se poate analiza de asemenea, apoptoza masivă din fragmente

embrionare de pasăre sau șoarece. Cu toate acestea, eficiența detectării nu este foarte bună, deoarece este nevoie ca 3% din celule să fie în stadiul corespunzător al apoptozei (Zakeri și Lockshin, 2002).

Protocol experimental 1

1. Țesutul apoptotic disecat din embrioni este digerat imediat cu 0,6 $\mu\text{g/ml}$ proteinază K, în 50 mM tampon Tris, cu 100 mM EDTA și 0,5% SDS, peste noapte, la 37°C.
2. Omogenatul este tratat cu 33 $\mu\text{g/ml}$ RNază A, extras cu fenol saturat și pus pe un gel de 2% agaroză, împreună cu bromură de etidiu.

Protocol experimental 2

1. Pentru a crește sensibilitatea detecției se lizează țesutul cu tampon de lizare.
2. Lizatul celular este ținut pe gheață, 15 minute
3. Centrifugare la 12.000g, 20 minute, la 4°C. Supernatantul conține ADN de greutate moleculară scăzută iar sedimentul ADN de greutate moleculară ridicată.
4. Incubarea supernatantului, o oră, cu RNază.
5. Extragerea ADN de două ori cu fenol/cloroform/alcool izoamilic (24:24:1) și o dată cu cloroform/alcool izoamilic (24:1).
6. Precipitarea ADN la -20°C, peste noapte, cu 300 mM NaCl și 2,5 volume etanol.
7. Vizualizarea ADN fragmentat prin electroforeză în gel de agaroză. După electroforeză gelurile sunt observate și fotografiate în lumină ultravioletă.

615

369

246

123

Fig.151. ADN ladder.

B. Metoda TUNEL

Această metodă permite marcarea oricărui capăt 3' liber din ADN. Marcarea poate fi vizibilă în celulele necrotice și în celulele mitotice în faza S, în special în cele cu număr mare de cromozomi. Majoritatea fragmentelor ADN sunt extrase din celulele necrotice și numărul de fragmente Okazaki în celule aflate în faza S a ciclului celular este mai mic decât numărul capetelor libere dintr-o celulă apoptotică. Astfel metoda TUNEL este relativă, deși de obicei diferența este suficientă pentru a fi luată în considerare. Din acest motiv necesitatea marțorilor pozitivi și negativi este esențială.

Metoda poate fi folosită pe secțiuni înghețate sau incluse în parafină, fixate prin diferite tehnici inclusiv cu etanol/acid acetic. Principiul de bază este cel de a identifica celulele cu ADN fragmentat.

Clivarea ADN poate furniza fragmente de ADN dublu catenare (mono sau oligonucleozomice), cu greutate moleculară scăzută, și breșe/crestături² monocatenare, în ADN de greutate moleculară mare. Aceste breșe pot fi detectate prin marcarea enzimatică a capătului terminal liber 3'-OH, cu nucleotide marcate cu biotină, digoxigenină sau fluoresceină. Enzimele de marcăre pot fi reprezentate de ADN polimerază (ISNT³) sau terminal deoxinucleotidil transferaza (TUNEL⁴) (Fig.152).

²Nicks, engl.

³In Situ Nick Translation

⁴Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling.

În metoda ISNT, ADN polimeraza I catalizează adăugarea dependentă de matriță a nucleotidelor la breșa monocatenară de ADN. Teoretic, această reacție detectează nu numai ADN din celulele apoptotice dar și fragmentarea întâmplătoare a ADN de către endonucleaze, care are loc în necroză.

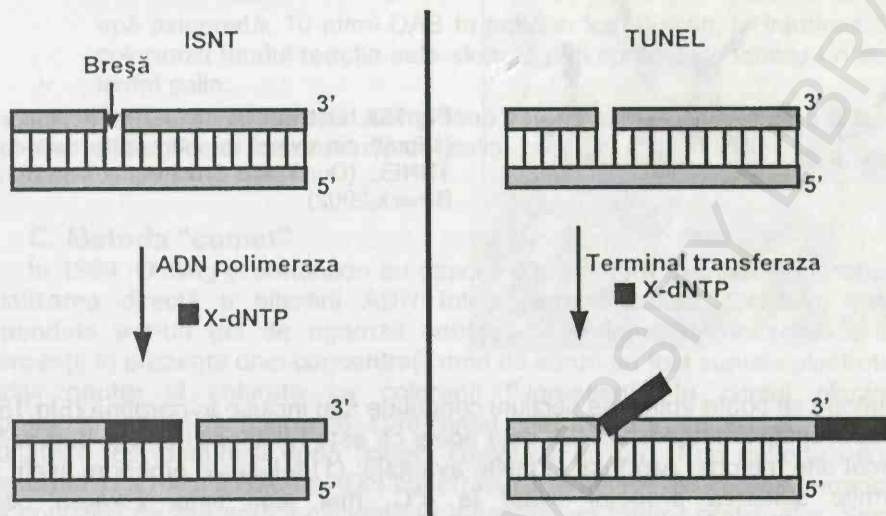


Fig.152. Reprezentarea schematică a celor două metode enzimatice de marcare a fragmentelor ADN.

În cazul metodei TUNEL, terminal deoxinucleotidil transferaza (TdT) este capabilă să marcheze independent de matriță, capetele breșelor din ADN dublu catenar.

Metoda TUNEL este mai sensibilă și mai rapidă decât ISNT. În plus, în stadiile timpurii, celulele care suferă apoptoza sunt marcate preferențial prin metoda TUNEL, în timp ce celulele necrotice sunt identificate prin metoda ISNT.

Pentru a permite enzimelor exogene să intre în celule, membrana plasmatică trebuie permeabilizată. Pentru a evita pierderea ADN de greutate moleculară mică din celulele permeabilizate, celulele sunt fixate cu formaldehidă sau glutaraldehidă înaintea permeabilizării. Această fixare leagă încrucișat ADN cu greutate moleculară mică de alte componente celulare și evită extragerea în cursul etapei de permeabilizare.

Dacă capetele 3' libere din ADN sunt marcate cu dUTP-biotină sau dUTP-digoxigenină, nucleotidele încorporate pot fi detectate cu avidină/ streptavidină sau cu un anticorp anti digoxigenină. Folosirea dUTP-fluoresceină permite detectarea directă în microscopia de fluorescență sau citometrie în flux. Marcarea directă cu fluoresceină oferă câteva avantaje: (1) produce colorări nespecifice mai reduse; (2) fluorescența poate fi convertită într-un semnal colorimetric, dacă se adaugă un anticorp anti fluoresceină, conjugat cu o enzimă.

Cinetica reacției depinde de durata fixării, eficiența tratamentului proteolitic, concentrația nucleotidelor și a enzimelor.

Pentru obținerea de rezultate reproductibile și sigure, tehnica TUNEL trebuie standardizată cu grijă. Acest lucru se poate realiza folosind secțiuni de țesut maror,

pozitive pentru apoptoză, tratate cu DNAză I, pentru a induce enzimatic formarea de breșe în ADN (Saraste,1999).

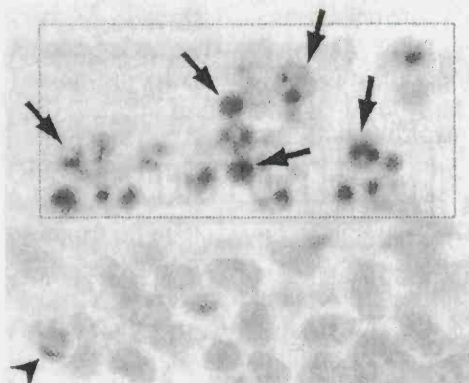


Fig.153. Detectarea celulelor apoptotice (săgeți) din ovarul de câine prin metoda TUNEL. (După Van Cruchten și Van den Broeck,2002).

Metoda se poate aplica pe secțiuni congelate sau incluse în parafină (Fig.153).

Dezavantajul metodei TUNEL este acela că este relativ scumpă și durează mai mult decât alte metode. Are însă și multe avantaje: (1) folosește embrioni fixați, ceea ce permite stocarea probelor fixate la 4°C, mai mult timp. Fixarea permite permeabilizarea embrionilor cu Triton X-100 și astfel pot fi detectate celule apoptotice profunde; (2) deoarece se poate folosi pentru detectare fluoresceina sau HRP, tehnica TUNEL poate fi cuplată cu alte metode de tipul imunohistochimiei; (3) în cazul folosirii streptavidinei cuplate cu peroxidază, embrionii pot fi secționați pentru a permite o analiză mai completă a distribuției celulelor apoptotice (Graham,1999).

Protocol experimental

1. Fixarea embrionilor de șoarece cu 4% paraformaldehidă în tampon fosfat salin, 2 ore, la temperatura camerei sau peste noapte la 4°C.
2. Spălarea embrionilor cu tampon fosfat salin, ce conține 1% Triton X-100, de trei ori, câte 30 minute fiecare baie.
3. Spălarea embrionilor cu tampon TdT.
4. Incubarea embrionilor în tampon de reacție. *Terminal transferaza este livrată de firmă (Boehringer Mannheim, Germania) împreună cu o soluție stoc 5X tampon terminal transferază și 25 mM CoCl₂. Viteza de polimerizare a bazelor purinice și pirimidinice depinde de includerea în amestecul de reacție a cationilor divalenți (Mg⁺⁺, Mn⁺⁺; Co⁺⁺).*
5. Spălare de trei ori în tampon fosfat salin cu 1% Triton X-100, în decurs de 30 minute.
6. Incubare peste noapte, la 4°C, cu streptavidină-FITC sau streptavidină-HRP, cu agitare.
7. Spălare în tampon fosfat salin cu 1% Triton X-100, trei băi, câte o oră fiecare baie.
8. Din acest punct detectarea celulelor apoptotice depinde de metoda aleasă pentru vizualizare.

Streptavidină-FITC

- Montare în 90% glicerol în tampon fosfat salin, cu 2,5% DABCO (*agent ce împiedică fotodecolorarea*). Vizionare la microscopul de fluorescență.

Streptavidină-HRP

- Spălare în tampon fosfat salin, 2 băi a câte 30 minute fiecare baie.
- Incubare cu agitare în 0,5 mg/ml DAB în tampon fosfat salin, 2-3 ore, în funcție de stadiul embrionar, la 4°C. Incubarea se realizează la întuneric.
- Se incubează 5-15 minute în soluția de mai sus la care se adaugă 60% apă oxigenată, 10 μ l/ml DAB în tampon fosfat salin, la întuneric. Când se colorează fondul reacția este stopată prin spălare de câteva ori cu tampon fosfat salin.
- Spălare tampon fosfat salin, două băi, 30 minute fiecare baie și montare în 90% glicerol în tampon fosfat salin.

C. Metoda "comet"

În 1984, Ostling și Johanson au descris o procedură microelectroforetică pentru vizualizarea directă a alterării ADN într-o singură celulă. Celulele mamiferelor suspendate într-un gel de agaroză subțire, pe o lamă de microscop, lizate cu detergenți, în prezența unei concentrații mari de săruri au fost supuse electroforezei în condiții neutre și colorate cu coloranți fluorescenți. În cursul electroforezei, fragmentele de ADN migrează spre anod mai repede decât nucleul. Imaginea rezultată a fost denumită după aspect cometă (Fig.154). Prin metoda originală se puteau măsura modificările în ADN superrăsucit rezultate din breșele monocatenare, însă condițiile de liză erau ineficiente în îndepărtarea tuturor proteinelor. Singh și al., (1988) au adaptat această procedură în condiții alcaline, modificare ce permite detectarea atât a fragmentelor de ADN dublu catenare cât și a rupturilor mono catenare.



Fig.154. Aspectul fragmentelor de ADN din celulele apoptotice supuse metodei "comet" și colorate cu un colorant fluorescent, specific pentru acizii nucleici.

Metoda se folosește în situația în care sunt disponibile puține celule și ele pot fi suspendate sau eliberate de matricea extracelulară. Asemănător tehnicii TUNEL, metoda „comet” depinde de reținerea de către celulele apoptotice a fragmentelor de ADN, dar în acest caz celulele individuale sunt incluse în agar și supuse unor câmpuri electrice. Fragmentele ADN pot fi forțate să iasă din celulă și atunci când se colorează cu Acridine orange sau Hoechst apar sub forma unei cozi de cometă. ADN intact se deplasează mai încet sau deloc și fragmentele mai mici din celulele necrotice difuzează rapid din celule (Olive,2002). Această tehnică este folositoare când pot fi izolate un număr mic dar adecvat de celule. Nu se folosește pentru analiza apoptozei în embrioni.

IV. DETECTAREA FOSFATIDILSERINEI EXPUSE

Una din modificările membranare care au loc în stadiile timpurii și intermediare ale apoptozei este reprezentată de translocarea fosfatidilserinei de pe fața internă pe cea externă a membranei plasmaticice. Fosfatidilserina se poate detecta folosind Annexin V marcată cu fluorocromi sau biotină. Annexin V este o proteină de 35-36 kDa, care leagă în prezența Ca^{2+} fosfatidilserina expusă pe fața externă a membranei plasmaticice. În celulele normale toate resturile de fosfatidilserină sunt menținute pe fața internă, citoplasmatică a membranei prin activitatea unor enzime dependente de ATP, numite "flippase" sau a transportorilor transmembranari. Când celula moare, pierde capacitatea de a păstra aceste enzime active. Utilizarea Annexin V marcată cu fluoresceină este o tehnică folosită în citometria în flux, însă dacă celulele și embrionii vii sunt examinați cu un microscop de fluorescență confocal celulele apoptotice apar fluorescente pe un fond întunecat. S-au obținut rezultate excelente cu embrioni de șoarece și pește zebură. Penetrarea proteinei în embrionul întreg poate fi o problemă și sunt posibile rezultate fals negative, chiar unde sunt detectate unele celule pozitive. Alternativ, Annexin V poate teoretic penetra și colora celulele distruse pentru a produce rezultate fals pozitive, deși în practică nu este un fenomen comun și nu reprezintă o problemă majoră. Ca și în cazul colorării vitale embrionul trebuie să fie viu. Colorarea este vizualizată prin microscopia de fluorescență (Fig.155, pentru varianta color vezi Planșa I11). Spre deosebire de metoda TUNEL și de coloranții vitali, Annexin V permite detectarea celulelor în fazele inițiale ale apoptozei.

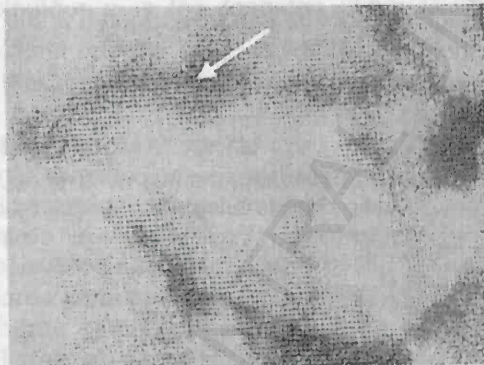


Fig.155. Membrana plasmatică a unui cardiomiocit embrionar de găină, colorată cu Annexin V cuplată cu Texas Red (fluorescență portocalie, săgeata). Citoplasma este pusă în evidență cu anticorpi față de o izoformă a lanțului greu al miozinei, cuplați cu FITC (fluorescență verde). (După Rothenberg și al.,2002).

Protocol experimental

1. Se accesează embrionul de găină în ou prin una din metodele prezentate în capitolul 1, subcapitolul *Gallus domestica*, secțiunea IIA.
2. Se injectează în vena vitelină 1 μ l soluție⁵ Annexin V, cuplată cu biotină sau cu fluoresceină.
3. După o oră se disecă țesutul de interes, se fixează prin concentrații crescătoare de etanol și se congelează în azot lichid, pentru secționarea la criotom.
4. Detectarea Annexin V cuplate cu biotină se realizează prin intermediul streptavidinei marcate cu fosfatază alcalină, peroxidază sau fluorocromi (vezi

⁵Annexin V se comercializează dizolvată în tampon 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, cu 100 mM NaCl.

capitolul 5, secțiunea II). Secțiunile ce conțin Annexin V conjugată cu fluoresceină se observă direct la microscopul de fluorescență confocal.

V. DETECTAREA LIZOZOMILOR ȘI A VACUOLELOR AUTOFAGICE

Majoritatea celulelor diferențiate au un volum citoplasmatic relativ scăzut și sunt fie încă în mitoză sau au ieșit recent din ciclul celular. Celulele autofagice sunt evidențiate prin densitatea și dimensiunea vacuolelor autofagice. Fosfataza acidă este o enzimă care rezistă secționării la criostat și chiar includerii în parafină. Este ușor de analizat folosind substrat pe bază de naftol, care se cuplează cu o sare de diazoniu (Fast garnet GBC), pentru a forma în țesut, precipitate insolubile de culoare roșie-brună. Alte enzime lizozomale pot fi detectate folosind substrat compatibile. Cu toate acestea, nu toate fagocitele sau vacuolele fagocitice sau autofagice sunt pozitive pentru fosfataza acidă și ar trebui testate și alte enzime lizozomale de tipul β -glucuronidazei.

Metoda este folositoare în multe situații, deși rolul autofagiei este subestimat. De exemplu, involuția epiteliului mamar este folosită adesea ca exemplu de apoptoză, însă autofagia este un proces major în aceste celule.

Protocol experimental

1. Fixarea țesutului 2 ore, în formol calcic, la 4°C.
2. Congelare în azot lichid și secționare la criotom. *Țesutul poate fi inclus în parafină însă activitatea fosfatazei acide este substanțial mai scăzută.*
3. Postfixare 30 de secunde, cu un amestec de tampon citrat (pH 3,6) : acetonă : 37% formaldehidă (13:33:4).
4. Spălare în apă bidistilată.
5. Incubare o oră la 37°C, cu substratul pentru fosfatază acidă.
6. Lamele sunt spălate, uscate, contrastate cu albastru de metilen și montate în glicerol. Activitatea fosfatazei acide este detectată sub forma unui precipitat de culoare roșie-brună.

VI. DETECTAREA ACTIVITĂȚII CASPAZEI-3

Caspaza-3 este o cistein protează activată la sfârșitul cascadei apoptotice. Este sechestrată în citoplasmă sub formă inactivă de zimogen și activată prin clivaj proteolitic de către alte caspaze. Ea clivează substrat proteice ce conțin secvența DEVD (aspartat-glutamat-valină-aspartat), aspartatul terminal fiind critic. Peptida DEVD poate fi cuplată cu un compus fluorescent (AFC⁶). În momentul în care peptida DEVD-AFC este clivată de caspaza-3, se eliberează AFC care poate fi monitorizat cu un fluorimetru. Pentru eliberarea enzimei, metoda necesită omogenizarea celulelor și țesuturilor și nu permite localizarea celulelor apoptotice și nici a tipului celular. Există de asemenea limitări referitoare la dimensiunea țesutului analizat. În cazul embrionilor este necesară recoltarea de material suficient pentru detectarea activității caspazei-3. Avantajul metodei constă în rapiditatea și evaluarea cantitativă a apoptozei. Este foarte potrivită pentru culturile celulare. În cazul țesuturilor complexe, cu mai multe

⁶7-amino-4-trifluorometilcumarină

tipuri celulare metoda poate fi folosită numai dacă un singur tip celular suferă apoptoza.

În celulele vii, pentru vizualizarea activității caspazei-3 se folosește peptida permeabilă **PhiPhiLux**. Aceasta face parte dintr-o clasă de substrat proteazice fluorogenice folosite inițial pentru a determina dacă epiteliul cornean detașat conține caspaza-3 activă. Molecula PhiPhiLux conține o secvență DEVD într-o peptidă, ce mimează conformația prezentă în situsurile de clivare proteazică din proteinele globulare. Compusul nu devine fluorescent decât în momentul clivării de către caspaza-3 (Fig.156, pentru varianta color vezi Planșa I12). PhiPhiLux pătrunde prin membrana plasmatică și poate oferi informații privind aspectul tridimensional al activității caspazei-3. Dezavantajele includ: (1) costul ridicat (2) folosirea unor concentrații ridicate; (3) nu poate pătrunde în țesuturile dense sau în embrionii întregi.

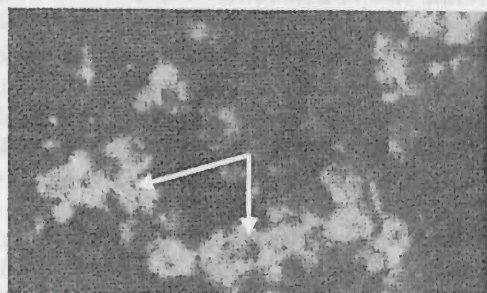


Fig.156. Colorarea cu PhiPhiLux a epiteliului cornean al unui embrion de găină de 8 zile (săgeți). (După Rothenberg și al.,2002).

Protocol experimental - determinarea cantitativă a caspazei-3

1. Se disecă regiunea embrionară dorită, care este mărunțită în tampon de lizare.
2. Se lasă în repaus, 30 minute, pe gheață.
3. Sonicare, 10 secunde, cu puls de 10%.
4. Centrifugare la 10.000g, 10 minute, la 4°C, pentru îndepărtarea proteinelor insolubile. Supernatanul se păstrează la -20°C.
5. Se determină cantitatea de proteină.
6. Incubarea lizatului cu substratul pentru caspaza-3, într-un volum total de 0,5 ml.
7. Măsurarea fluorescenței la un spectrofotometru cu excitație la 400 nm și emisie la 504 nm.

Fiecare din metodele prezentate prezintă avantaje și dezavantaje astfel încât fiecare cercetător trebuie să aleagă metoda/metodele potrivite tipului de embrion sau țesutului ce urmează a fi analizat (Tabel 17).

Tabel 17. Avantajele și dezavantajele metodelor apoptotice

Metoda	Avantaje	Dezavantaje	Recomandări
Microscopie optică	<ul style="list-style-type: none"> • Se pot analiza regiuni mari sau embrioni întregi • Este posibilă o analiză amănunțită a țesutului 	<ul style="list-style-type: none"> • Difil de menținut antigenitatea pentru imunohistochimie sau analize enzimatice 	Secțiuni cu niveluri scăzute sau mari de apoptoză
Microscopie electronică	<ul style="list-style-type: none"> • Definitivă • Se pot observa caracteristicile ultrastructurale ale celulelor apoptotice 	<ul style="list-style-type: none"> • Consumatoare de timp • Se poate analiza la un moment dat numai o regiune mică de țesut • Procesarea țesuturilor poate reduce antigenitatea 	Pe secțiuni cu regiuni apoptotice mari sau după localizarea celulelor în secțiuni semifine
Acridine orange	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid • Ieftin • Fluorescent • Penetreează țesuturile 	<ul style="list-style-type: none"> • Toxic • Mutagen • Induce fototoxicitate • Se fotodecolorează rapid 	Embrioni mici <i>in toto</i> (<i>Drosophila</i> , <i>D. rerio</i> , găină) și țesuturi
Albastru de Nile	<ul style="list-style-type: none"> • Rapid • Ieftin 	<ul style="list-style-type: none"> • Nu penetreează țesuturile groase • Se pierde în timpul procesării pentru secționare • Greu de observat în țesuturile groase sau opace 	Embrioni transparentți, organe, țesuturi <i>in toto</i>
LTR	<ul style="list-style-type: none"> • Ieftin • Rapid • Penetreează țesuturile groase • Stabil în cursul fixării și deshidratării • Rezistent la fotodecolorare • Permite reținerea antigenității 	<ul style="list-style-type: none"> • Posibile rezultate pozitive pentru celule care au compartimente acide (macrofage, ovocite) • Necesitatea permeabilizării pentru a observa embrionii <i>in toto</i> 	Embrioni, țesuturi și organe <i>in toto</i> ; culturi celulare
Metoda TUNEL	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibile kit-uri 	<ul style="list-style-type: none"> • Scump • Consumator de timp • Adesea necesită pretratamente dure (microunde, proteinaza K) • False rezultate pozitive 	Secțiuni histologice incluse în parafină sau congelate
Annexin V	<ul style="list-style-type: none"> • Detectează celulele apoptotice în stadii mai timpurii decât se pot detecta prin metoda TUNEL • Permite marcarea 	<ul style="list-style-type: none"> • Scump pentru studiile pe embrioni întregi • Rezultate variabile prin injectarea în animal 	Embrioni mici, culturi celulare, sortare celulară

	dublă sau triplă (asociere cu imunohistochimie)		
Caspaza-3	<p>Metoda cantitativă</p> <ul style="list-style-type: none"> • Disponibile kit-uri • Cantitativă <p><u>PhiPhiLux</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Specific pentru caspaza-3 • Detectează apoptoza în celule vii 	<ul style="list-style-type: none"> • Nu poate identifica celule specifice sau țesuturile unde are loc apoptoza • Sunt necesare cantități substanțiale de țesut, cu o populație mare de celule apoptotice • Permeabilitate limitată 	Culturi celulare sau explante de țesut

(După Watanabe și al., 2002)

VII. MEDII ȘI SOLUȚII

■ Acetat de uranil

1,25 g acetat de uranil; 25 ml metanol absolut. Soluția se agită până rămân puține precipitate. Se păstrează în sticlă închisă la culoare (acoperită cu folie de aluminiu), la temperatura camerei. *Acetatul de uranil este toxic și trebuie manipulat cu mănuși, în hotă.*

■ Acridin orange

Soluție stoc: 5 mg/ml în apă distilată sterilă.

Soluție de lucru: se diluează soluția stoc în tampon fosfat salin la o concentrație finală de 5 μg/ml.

■ Albastru de toluidină

Se dizolvă cu agitare 0,25 g borat de sodiu în 25 ml apă distilată. Se adaugă 0,25 g albastru de toluidină O și se agită până la dizolvarea colorantului. *Dacă soluția conține precipitate se filtrează prin filtru Whatman #1 sau prin filtru de 0,45 μm.* Se pune soluția într-o sticlă picătoare.

■ Citrat de plumb

Se adaugă într-un balon cotat de 50 ml 1,33 g nitrat de plumb, 1,76 g citrat trisodic $\cdot 2H_2O$ și 30 ml apă distilată deionizată. Se agită viguros 1 minut. Se lasă în repaus 30 minute, agitându-se ocazional. Se adaugă 8 ml 1N NaOH. Se aduce soluția la 50 ml cu apă distilată deionizată și se amestecă prin inversarea balonului cotat. Soluția este stabilă până la 6 luni. Turbiditatea poate fi îndepărtată prin centrifugare.

■ Epon 812

Soluție stoc Epon A: 62 ml Epon 812; 100 ml DDSA (dodecil succinic anhidridă).

Soluție stoc Epon B: 100 ml Epon 812; 89 ml NMA (nadic metil anhidridă).

Amestec de incluzie: 10 ml Epon A; 15 ml Epon B; 0,5 ml DMP-30 [2,4,6-tri(dimetilaminometil)fenol]. Se amestecă bine. Soluțiile Epon A și B pot fi stocate la 4°C, cel puțin șase luni. *Pentru realizarea amestecului de incluzie,, recipientele în care se găsesc cele două soluții se deschid numai după ce au luat temperatura camerei. Toate rășinile epoxidice sunt toxice. Se recomandă manipularea lor cu mănuși, în nișă, pentru a evita răspândirea vaporilor.*

■ Formol calcic

10 ml 40% formaldehidă; 90 ml apă distilată; 10 ml 10% CaCl_2 .

■ Hematoxină Carazzi

0,5 g hematoxină; 100 ml glicerol; 25 g alaun de potasiu; 400 ml apă distilată; 0,1 g iodat de potasiu. Se dizolvă peste noapte, hematoxina în glicerol și alaunul de potasiu în 300 ml de apă distilată. Se adaugă încet soluția de alaun de potasiu la hematoxină și se amestecă foarte bine după fiecare adăugare. Se dizolvă iodatul în restul de apă, cu încălzire ușoară și se adaugă la amestecul hematoxină-alaun-glicerol cu agitare viguroasă. Soluția este stabilă 6 luni.

■ Soluție Tyrode

80 g NaCl; 2 g KCl; 2,71 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 10 g glucoză la un litru apă distilată. Această soluție poate fi autoclavată și diluată cu apă distilată sterilă înainte de folosire.

■ Substrat caspaza-3

100 mM HEPES pH 7,5; 10% zaharoză; 0,1% CHAPS; 1 mM PMSF; 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin; 1 mM EDTA; 25 μM peptida DEVD-AFC (Biomol). Volum total 0,5 ml.

■ Substrat fosfatază acidă

100 ml 0,2 M tampon acid acetic-acetat, pH 5; 30 mg Fast garnet GBC (sare de diazoniu); 25 mg α -naftil fosfat. Soluția se prepară extemporaneu.

■ Tampon fosfat salin

Soluție stoc 10X: 81,8 g NaCl; 2 g KCl; 11,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2 g KH_2PO_4 ; 1000 ml apă bidistilată.

■ Tampon de reacție TUNEL

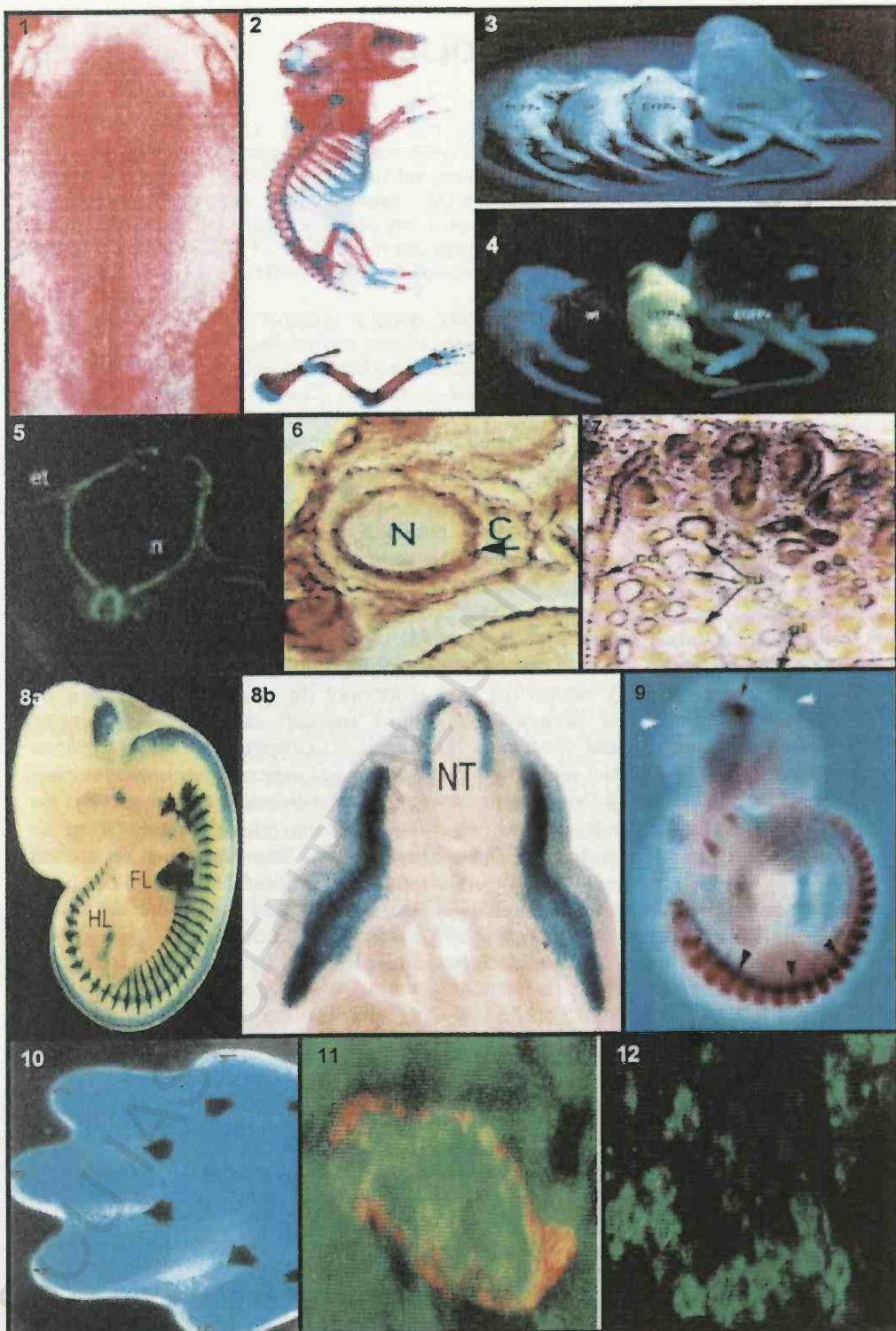
1X tampon terminal transferază; 2,5 mM CoCl_2 ; 0,5 $\mu\text{g/ml}$ terminal transferază; 10 mM dUTP (2:1 dUTP:dUTP-biotin); 1% Triton X-100. *Tarminal transferaza este livrată de firmă (Boehringer Mannheim, Germania) împreună cu o soluție stoc 5X tampon terminal transferază și 25 mM CoCl_2 . Viteza de polimerizare a bazelor purinice și pirimidinice depinde de includerea în amestecul de reacție a cationilor divalenți (Mg^{++} , Mn^{++} ; Co^{++}).*

■ Tampon lizare electroforeză

0,2% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; pH 7,5.

■ Tampon lizare pentru caspaza-3

100 mM HEPES pH 7,5; 10% zaharoză; 0,1% CHAPS; 1 mM PMSF; 10 µg/ml pepstatin; 10 µg/ml leupeptin; 1 mM EDTA; 10 mM DTT.



PLANȘA I

Planșa I. 1-Embrion de găină în stadiu de linie primitivă, injectat cu soluție colorantă. 2-Scheletul unui nou-născut colorat cu Albastru alcian și Roșu de alizarină. Osul se colorează în roșu și cartilajul în albastru (vezi figura 54). 3-Șoareci transgenici și normali observați la microscopul cu câmp luminos (vezi figura 67E). 4-Șoareci transgenici și normali observați la microscopul de fluorescență, cu filtre corespunzătoare pentru diferite forme de GFP (vezi figura 67F). 5-Detectarea prin imunofluorescență, cu anticorpi secundari marcați cu FITC, a metaloproteazelor, la nivelul membranei bazale ce delimitează ectodermul (et) și tubul neural (n), din embrionul de găină. 6-Detectarea α -tubulinei (săgeata), cu anticorpi secundari marcați cu HRP, în ovocite previtelogenice de *Rana ridibunda*. N-nucleu. C-citoplasmă. 7-Identificarea proteinei Lim-1 în rinichiul embrionar de șoarece, cu anticorpi secundari cuplați cu fosfatază alcalină. 8-Detectarea transgenei *Myf-5-lacZ* într-un embrion de șoarece de 11 zile jumătate, prin colorarea β -galactozidazei *in toto* (a) și pe secțiuni (b). Vezi figura 141. 10-Zone de apoptoză interdigitală, marcate cu Albastru de Nile (săgeți), în mugurii membrilor embrionilor de găină (vezi figura 148). 11-Membrana plasmatică a unui cardiomiocit embrionar de găină, colorată cu Annexin V cuplată cu Texas Red (fluorescență portocalie). Citoplasma este pusă în evidență cu anticorpi față de o izoformă a lanțului greu al miozinei, cuplați cu FITC (fluorescență verde). Vezi figura 155. 12-Colorarea cu PhiPhiLux a epitelului cornean al unui embrion de găină de 8 zile (vezi figura 156).

BIBLIOGRAFIE

- Adams M.D., Sekelsky J.J., 2002, From sequence to phenotype: Reverse genetics in *Drosophila melanogaster*. *Nature Rev. Genet.* **3**, 189-198.
- Amaya E., Kroll K.L., 1999, A method for generating transgenic frog embryos. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 393-414.
- Angerer L. M., Angerer R. C., 1992, *In situ* hybridization to cellular RNA with radiolabelled RNA probes. In: *In situ Hybridization: A Practical Approach* (D. G. Wilkinson, Ed), Oxford Univ. Press, 15-32.
- Arnhold S., Lenartz D., Kruttwig K., 2000, Differentiation of green fluorescent protein-labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J. Neurosurg.* **93**, 1026-1032.
- Bongso A., Fong C-Y., Ng S.C., Ratnam S., 1994, Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum. Reprod.* **11**, 2110-2117.
- Bratthauer G.L., 1994, The peroxidase-antiperoxidase (PAP) method. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 34: *Immunocytochemical Methods and Protocols* (L. C. Javois, Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 165-173.
- Bunea M., Zărnescu O., 2001, New current aspects on the immunohistochemical techniques. *Roum. Biotechnol. Lett.* **6**, 177-206.
- Cepko C.L., Ryder E.F., Austin C.P., Walsh C., Fekete D.M., 1993, Lineage Analysis using retroviral vectors. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 225: *Guide to techniques in mouse development* (P.M. Wassarman, M.L. DePamphilis, Eds.), Academic Press, Inc San Diego, 933-960.
- Clarke J.D.W., Tickle C., 1999, Fate maps old and new. *Nature Cell Biol.* **1**, E103-E108.
- Coggi G., Dell'Orto P., Viale G., 1986, In: *Immunocytochemistry: Modern Methods and Applications*, (J.M. Polak, S. Van Noorden, Eds.), John Wright & Sons Ltd, 54-70.
- Couly G.F., Coltey P.M., Le Douarin N.M., 1993, The triple origin of skull in higher vertebrates: a study in quail-chick chimeras. *Development* **117**, 409-429.
- Cox K. H., Deleon D.V., Angerer L.M., Angerer R.C., 1984, Detection of mRNA in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Dev. Biol.* **101**, 485-502.
- Dagle J.M., Weeks D.L., 2001, Oligonucleotide-based strategies to reduce gene expression. *Differentiation* **69**, 75-82.
- Darnell D. K., Schoenwolf G. C., 1997, Modern techniques for cell labeling in avian and murine embryos. In: *Molecular and Cellular Methods in Developmental Toxicology*, CRC Press Inc, 231-273.
- De Arcangelis A., Mark M., Kreidberg J., Sorokin L., Georges-Labouesse E., 1999, Synergistic activities of $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development* **126**, 3957-3968.
- Downs K. M., Davies T., 1993, Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* **118**, 1255-1266.
- Duffy J.B., 2002, GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's swiss army knife. *genesis* **34**, 1-15.
- Edgar L. G., Wood W.B., 1993, Nematode embryos. In: *Essential Developmental Biology. A Practical Approach* (C. D. Stern, P. W.H. Holland, Eds), Oxford Univ. Press, 11-20.
- Evans M.J., Kaufman M.H., 1981, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
- Eyal-Giladi H., Kochav S., 1975, From cleavage to primitive streak formation; a complementary Normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Develop. Biol.* **49**, 321-337.

- Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C., 1998, Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Forbes Z., Ingham P., 1993, *Drosophila* embryos. In: Essential Developmental Biology. A Practical Approach (C. D. Stern, P. W. H. Holland, Eds), Oxford Univ. Press, 3-10.
- Franco D., de Boer P. A.J., de Gier-de Vries C., Lamers W.H., Moorman A.F.M., 2001, Methods on *in situ* hybridization, immunohistochemistry and β -galactosidase reporter gene detection. *Eur. J. Morphol.* **39**, 3-25.
- Garcia-Bellido A., Merriam J.R., 1969, Cell lineage of the imaginal discs in *Drosophila* gynandromorphs. *J. Exp. Zool.* **170**, 61-76.
- Gardner R.L., Davies T.J., 1999, Mouse chimeras and the analysis of development, In: Methods in Molecular Biology, vol. 135: *Developmental Biology Protocols*, Vol. 1 (R.S. Tuan, C.W. Lo, Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 397-424.
- Graham A., 1999, Whole embryo assays for programmed cell death. In: Methods in Molecular Biology, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 667-672.
- Hadjantonakis A-K., Nagy A., 2001, The color of mice: in the light of GFP-variant reporters. *Histochem Cell Biol* **115**, 49-58.
- Hamburger V., Hamilton H. L., 1951, A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol* **88**, 49-92.
- Harvey B., 1998, Autoradiography and fluorography. In: *Molecular Biomethods Handboock*. (R. Rapley, Walker J.M., Eds), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 109-119.
- Heasman J., Kofron M., Wylie C., 2000, Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: A novel antisense approach. *Dev. Biol.* **222**, 124-134.
- Heasman J., 2002, Morpholino oligos: Making sense of antisense? *Dev. Biol.* **243**, 209-214.
- Herrera P.L., 2000, Adult insulin- and glucagon-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* **127**, 2317-2322.
- Herrera P.L., 2002, Defining the cell lineages of the islets of Langerhans using transgenic mice. *Int. J. Dev. Biol.* **46**, 97-103.
- Hirsch N., Zimmerman L.B., Grainger R.M., 2002, *Xenopus*, the next generation: *X. tropicalis* genetics and genomics. *Dev. Dyn.* **225**, 422-433.
- Hogan B., Beddington R., Constantini F., Lacy E., 1994, Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hotta Y., Benzer S., 1973, Mapping of behavior in *Drosophila* mosaics. In: Genetic Mechanism of Development (F. Ruddle, Ed), Academic Press, New York, 129-167.
- Kerr J.F.R., Winterford C.M., Harmon B.V., 1994, Morphological criteria for identifying apoptosis. In: *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, vol.1, (J.E. Celis, Ed), Academic Press (London), 319-329.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullman B., Schilling T. F., 1995, Stages of embryonic development of the zebrafish. *Develop. Dynam.* **203**, 253-310.
- Klymkowsky M.W., Hanken J., 1991, Whole-mount staining of *Xenopus* and other vertebrates. In: Methods in Cell Biology, Vol. 36: *Xenopus laevis: Practical Uses in Cell and Molecular Biology* (B.K. Kay, H. B. Peng, Eds), Academic Press Inc., 419-441.
- Kozlowski D.J., Murakami T., Ho R.K., Weinberg E.S., 1997, Regional cell movement and tissue patterning in the zebrafish embryo revealed by fate mapping with caged fluorescein. *Biochem. Cell Biol.* **75**, 551-562.
- Kulesa P.M., Fraser S.E., 1999, Confocal imaging of living cells in intact embryos. In: Methods in Molecular Biology, vol. 122: *Confocal Microscopy Methods and Protocols* (S. Paddock, Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 205-222.
- Kwan K-M., 2002, Conditional alleles in mice: Practical considerations for tissue-specific knockouts. *Genesis* **32**, 49-62.
- Lanzendorf S. E., Boyd C.A., Wright D.L., Muasher S., Oehninger S., Hodgen G.D., 2001, Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil. Steril.* **76**, 132-137.
- Lawson K.A., 1999, Fate mapping the mouse embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **43**, 773-775.

- Le Douarin N., Dieterlen-Lievre F., Teillet M.-A., 1996, Quail-Chick Transplantations. In: *Methods in Cell Biology*, vol. 51: *Methods in Avian Embryology* (M. Bronner-Fraser, Ed.), Academic Press Inc., 23-59.
- Leber S.M., Yamagata M., Sanes J.R., 1996, Gene transfer using replication-defective retroviral and adenoviral vectors. In: *Methods in Cell Biology*, vol. 51: *Methods in Avian Embryology* (M. Bronner-Fraser, Ed.), Academic Press Inc., 161-183.
- Lele Z., Bakkers J., Hammerschmidt M., 2001, Morpholino phenocopies of the *swirl*, *snailhouse*, *somitabun*, *minifin*, *silberlick*, and *pipetail* mutations. *Genesis* **30**, 190-194.
- Muller U., 1999, Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis. *Mech. Dev.* **82**, 3-21.
- Mahmood R., Mason I., 1999, *In situ* hybridization of radioactive riboprobes to RNA in tissue sections. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 611-621.
- Majno G., Joris I., 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**, 3-14.
- Mansouri A., 1998, Gene targeting by homologous recombination in embryonic stem cells. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook* (J.E. Celis, Ed.), Second Edition, vol.3, Academic Press, 478-486.
- Martin G.R., 1981, Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 7634-7638.
- Melan M. A., 1994, Overview of cell fixation and permeabilization. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 34: *Immunocytochemical Methods and Protocols* (L. C. Javois, Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 55-66.
- Moody S., 1999, Testing the cell fate commitment of single blastomeres in *Xenopus laevis*. In: *A Comparative Methods Approach to the Study of Oocytes and Embryos* (J.D. Richter, Ed.), 355-381.
- Nieto A.M., Patel K., Wilkinson D.G., 1996, *In situ* hybridization analysis of chick embryos in whole mount and tissue sections. In: *Methods in Cell Biology* vol. 51: *Methods in Avian Embryology* (M. Bronner-Fraser, Ed), Academic Press Inc., 219-235.
- Nieukoop P.D., Faber J., 1967, Normal table of *Xenopus laevis* (Daudin). Elsevier/North Holland, Amsterdam.
- Olive P.L., 2002, The comet assay. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol 203: *In Situ Detection of DNA Damage: Methods and Protocols*, (V.V. Didenko, Ed.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 179-194.
- Oliver C., 1994, Postembedding labeling methods. In: *Methods in Molecular Biology*, vol.34: *Immunocytochemical Methods and Protocols*, (Ed. L.C. Javois) Humana Press (Inc), pag. 321-328.
- O'Shea K.S., 1999, Embryonic stem cell models of development. *Anat. Rec.* **257**, 32-41.
- Ostling O., Johanson K.L., 1984, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 291-298.
- Pavlat G.K., Luskin M.B., 1999, Gene transfer to the rodent embryo by retroviral vectors. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 519-538.
- Peters K. G., Rao P. S., Bell B. S., Kindman L. A., 1995, Green fluorescent fusion proteins: powerful tools for monitoring protein expression in live zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **171**, 252-257.
- Prelle K., Zink N., Wolf E., 2002, Pluripotent stem cells-model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat. Histol. Embryol.* **31**, 169-186.
- Price J., 1993, Introduction of genes using retroviral vectors. In: *Essential Developmental Biology. A Practical Approach* (C. D. Stern, P. W.H. Holland, Eds), Oxford Univ. Press, 179-190.
- Quinlan G.A., Davidson B.P., Tam P.L.P., 2001, Lineage allocation during early embryogenesis. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 158: (M.J. Tymms, I. Kola, Eds.), Humana Press Inc., Totowa, NJ, 227-250.

- Quinlan G.A., Trainor P.A., Tam P.P.L.,1999, Cell grafting and labeling in postimplantation mouse embryos. In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc.,Totowa, NJ, 41-59.
- Rosen B., Beddington R. S. P.,1993, Whole-mount *in situ* hybridization in the mouse embryo: gene expression in three dimensions. *Trends Genet.* **9**, 162-167.
- Rothenberg F., Hitomi M., Fisher S.A., Watanabe M.,2002, Initiation of apoptosis in the developing avian outflow tract myocardium. *Develop. Dynam.* **223**, 469-482.
- Rubin G.M., Spradling A.C.,1982, Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-353.
- Ruiz I Altaba A., *Xenopus*. In: *Essential Developmental Biology. A Practical Approach* (C. D. Stern, P. W.H. Holland, Eds), Oxford Univ. Press, 39-44.
- Sanders E.J., Wride M.A.,1995, Programmed cell death in development. *Int. Rev. Cytol.* **163**, 105-173.
- Saraste A., Pulkki K., Kallajoki M.,1999, Cardiomyocyte apoptosis and progression of heart failure to transplantation. *Eur. J. Clin. Invest* **29**, 380-386.
- Sassoon D., Rosenthal N.,1993, Detection of messenger RNA by *in situ* hybridization. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 225: *Guide to techniques in mouse development* (P.M. Wassarman, M.L. DePamphilis, Eds.), Academic Press, Inc San Diego, 384-404.
- Schoenwolf G. C.,1995, Laboratory Studies of Vertebrate and Invertebrate Embryos. Guide and Atlas of Descriptive and experimental Development. Seventh edition. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Selleck M. A. J.,1996, Culture and microsurgical manipulation of the early avian embryo. In: *Methods in Cell Biology* vol. 51: *Methods in Avian Embryology* (M. Bronner-Fraser, Ed), Academic Press Inc.,1-21.
- Shih J., Fraser S.E.,1996, Characterizing the zebrafish organizer: microsurgical analysis at the early-shield stage. *Development* **122**, 1313-1322.
- Si-Hoe S.L., Wells S., Murphy D.,2001, Production of transgenic rodents by microinjection of cloned DNA into fertilized one-cell eggs. *Mol. Biotechnol.* **17**, 151-182.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.,1988, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**, 184-191.
- Smith L. D., Xu w., Varnold R. L.,1991, Oogenesis and oocyte isolation. In: *Methods in Cell Biology*, Vol. 36: *Xenopus laevis: Practical Uses in Cell and Molecular Biology* (B.K. Kay, H. B. Peng, Eds), Academic Press Inc., 45-60.
- Solter D., Skreb N., Damjanov I.,1970, Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* **227**, 503-504.
- Spergel D. J., Kruth U., Shimshek D. R., Sprengel R., Seeburg P. H.,2001, Using reporter genes to label selected neuronal populations in transgenic mice for gene promoter, anatomical, and physiological studies. *Progress in Neurobiology* **63**, 673-686.
- Stanford W.L., Cohn J.B., Cordes S.P.,2001, Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nature Rev. Genet.* **2**, 756-768.
- Stern C.D., Ireland G.W.,1981, An integrated experimental study of endoderm formation in avian embryos. *Anat. Embryol.* **163**, 245-263.
- Stern C.D.,1993, Avian embryos. In: *Essential Developmental Biology: A Practical Approach*, (C. D. Stern, P. W. H.Holland, Eds.), Oxford Univ. Press, 45-54.
- Stevens L.C.,1970, The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and post-implantation mouse embryos. *Dev. Biol.* **21**, 364-382.
- Sturtevant A.H.,1929, The claret mutant type of *Drosophila simulans*: A study of chromosome elimination and of cell lineage. *Z. Wiss. Zool.* **135**, 323-356.
- Summert J., Weller D.,1997, Morpholino antisense oligomers: Design, preparation and properties. *Antisense Nucleic Acids Drug. Dev.* **7**, 187-195.
- Tabata T.,2001, Genetics of morphogen gradients. *Nature Rev. Genet.* **2**, 620-630.
- Teillet M.A., Ziller C., Le Douarin N.M.,1999, In: *Methods in Molecular Biology*, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc.,Totowa, NJ, 305-318.
- Theiler K.,1972, The House Mouse. Springer-Verlag, New York.

- Theiler K.,1983, Embryology in the Mouse in Biomedical Research, Vol.3, Academic Press, New York.
- Trainor P.A., Zhou S.X., Parameswaran M., Quinlan G.A., Gordon M., Sturm K., Tam P.P.L.,1999, Application of *lacZ* transgenic mice to cell lineage studies. In: Methods in Molecular Biology, vol. 97: *Molecular Embryology: Methods and Protocols* (P. T. Sharpe, I Mason, Eds.), Humana Press Inc.,Totowa, NJ, 183-200.
- Van Cruchten S., Van den Broeck W.,2002, Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* **31**, 214-223.
- Van Noorden S.,1986, Tissue preparation and immunostaining techniques for light microscopy. In: Immunocytochemistry: Modern Methods and Applications, (J.M.Polak, S.Van Noorden, Eds.), John Wright & Sons Ltd, 26-49.
- Waddington C.H.,1932, Experiments on the development of chick and duck embryo, cultivated in vitro. *Philos. Trans. R. Soc. London, ser. B* **221**, 179-230.
- Warga R. M.,1993, Zebrafish embryos. In: Essential Developmental Biology. A Practical Approach (C. D. Stern, P. W.H. Holland, Eds), Oxford Univ. Press, 33-37.
- Watanabe M., Hitomi M., Van der Wee K., Rothenberg F., Fisher S.A., Zuker R., Svoboda K.K.H., Goldsmith E.C., Heiskanen K.M., Nieminen A-L.,2002, The pros and cons of apoptosis assays for use in the study of cells, tissues and organs. *Microsc. Microanal.* **8**, 375-391.
- Werner M., Von Wasielewski R., Komminoth P.,1996, Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem. Cell Biol* **105**, 253-260.
- Westerfield M.,1994, The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of the Zebrafish (*Danio Rerio*). Eugene OR: University of Oregon, Institute of Neuroscience, 1994
- Wieschaus E., Nusslein-Volhard C.,1986, Looking at embryos. In: *Drosophila: A Practical Approach* (D.B. Roberts, Ed.), Oxford IRL Press, 199-227.
- Wilson T., Hastings J.W.,1998, Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 197-230.
- Yamaguchi M., Saito H., Suzuki M., Mori K.,2000, Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-*gfp* transgenic mice. *NeuroReport* **11**, 1991-1996.
- Yu Y. A., Oberg K., Wang G., Szalay A. A.,2003, Visualization of molecular and cellular events with green fluorescent proteins in developing embryos: A review. *Luminescence* **18**, 1-18.
- Zărnescu O., Lazăr S., Caloianu M.,1997, Ultrastructural localisation of actin in oocyte of edible frog, *Rana ridibunda* by protein A-gold technique. *Proceedings of 13th National Electron Microscopy Congress*. Ankara, (Tekin E., Canberk Y., Eds), 444-449.
- Zărnescu O.,1999, Biologia dezvoltării, Partea I, Editura Univ. București, 222 pag.
- Zărnescu O.,2002, Biologia dezvoltării, Partea a II-a, Editura Univ. București, 260 pag.
- Zărnescu O.,2002, Immunocytochemical localization of actin and α -tubulin in previtellogenic oocytes of *Carassius auratus gibelio*. *Rev. Roum. Biol. Biol. Anim.* **47**, 55-60.
- Zakeri Z., Lockshin A.,2002, Cell death during development. *J. Immunol Method.* **9055**,
- Zamore P.D.,2001, RNA interference: listening to the sound of silence.
- Zernicka-Goetz M., Pines J., Ryan K., Siemering K.R., Haseloff J., Evans M.J., Gurdon J.B.,1996, An indelible lineage marker for *Xenopus* using a mutated green fluorescent protein. *Development* **122**, 3719-3724.

10843/03

Tiparul s-a executat sub cda 1104/2003
la Tipografia Editurii Universității din București

B.C.U. „M. EMINESCU” IAȘI

150.000

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conf. univ. dr. Otilia Zărnescu, autoare a peste 60 de lucrări științifice publicate în țară și străinătate, a participat la numeroase congrese internaționale și naționale, și a fost profesor invitat la Nagoya City University (Japonia).

Lucrarea de față reprezintă prima sinteză de embriologie experimentală apărută în România și conține o colecție de tehnici, dintre care multe sunt abordate prin prisma profesionalismului autoarei. Cartea vine să completeze cele două părți ale manualului de *Biologia dezvoltării*, apărut la Editura Universității din București, în anii 1999 și 2002.



EDITURA UNIVERSITĂȚII DIN BUCUREȘTI